



**LAHDEN AMMATTIKORKEAKOULU**  
*Lahti University of Applied Sciences*

# MIKROLEVIEN SOVELTUVUUS BIODIESELIN TUOTANTOON

Lipidikoostumus ja uuttomenetelmien vertailu

LAHDEN  
AMMATTIKORKEAKOULU  
Tekniikan ala  
Ympäristötekniikan koulutusohjelma  
Ympäristöbiotekniikka  
Opinnäytetyö  
Kevät 2015  
Riikka-Juulia Koivula

Lahden ammattikorkeakoulu  
Ympäristötekniologia

KOIVULA, RIIKKA-JUULIA:

Mikrolevien soveltuvuus  
biodieselin tuotantoon  
Lipidikoostumus ja  
uutomenetelmien vertailu

Ympäristöbiotekniikan opinnäytetyö, 40 sivua

Kevät 2015

## TIIVISTELMÄ

---

Fossilisten polttoaineiden vähentyminen ja kasvava energiantarve edellyttävät bioperäisten polttoaineiden kehittämistä. Mikrolevien käyttö biodieselin raaka-aineena herättää kiinnostusta, sillä ne kasvavat nopeasti ja sisältävät runsaasti lipidejä, eikä niiden kasvatus vaadi laajoja maa-alueita.

Tämä opinnäytetyö tehtiin osana ALDIGA-projektia, joka tutki mahdollisuuksia ekotehokkaaseen levämassan bioenergiatuotantoon. Tämän työn tarkoitus oli selvittää kahden mikrolevälajin (*Chlorella sorokiniana* ja *Selenastrum sp.*) soveltuvuus biodieselin raaka-aineeksi ja vertailla kahta eri lipidien uutomenetelmää. Mikrolevät kasvatettiin suljetuissa fotobioreaktoreissa ja niistä uutettiin lipidit kahdella eri tavalla. Uutomenetelmiä vertailtiin saantojen ja ohutlevykromatografian avulla. Uutetut lipidit metyloitiin rasvahappojen metyyliestereiksi, jotka analysoitiin kvantitatiivisesti kaasukromatografi-massaspektometrillä. Rasvahappoprofiilin perusteella laskettiin biodieselin laatuparametreja, joita vertailtiin SFS-EN 14214-standardiin.

Biomassan kasvunopeus oli *C. sorokinianalla* 40,3 mg/l/vrk ja *Selenastrumilla* 71,3 mg/l/vrk. *C. sorokinianasta* uutui liuotinuutolla lipidejä 15,3 % kuivapainosta ja *Selenastrumin* liuotinuutossa uutui 55,2 %. Rasvahappoja oli uutetuissa lipideissä 4.6 % ja 7.9 %. Ylikriittisellä uutolla tulokset olivat huomattavasti pienempiä. Liuotinuuton todettiin soveltuvan paremmin lipidien uuttoon kuin ylikriittisen uuton. Polttoaineominaisuuksiensa perusteella liuotinuutettu *Selenastrum* oli polttoainekäyttöä ajatellen parempi kuin *C. sorokiniana*, sillä *C. sorokinianan* liuotinuuton setaaniluku ja linoleenihapon määrä ei täyttänyt standardin vaatimuksia ja *Selenastrumin* kinemaattinen viskositeetti oli parempi kuin *C. sorokinianan*.

Kumpikaan laji ei näissä olosuhteissa kasvatettuna sovellu biodieselin tuotantoon puutteellisten polttoaineominaisuuksien ja pienten saantojen johdosta. *Selenastrum* vaikuttaa kuitenkin lupaavalta, jos lipidien määrää ja laatua saadaan muokattua kasvatusolosuhteita muuttamalla.

Asiasanat: ALDIGA, mikrolevä, fotobioreaktori, biodiesel, rasvahappoprofiili

Lahti University of Applied Sciences  
Degree Programme in Environmental Technology

KOIVULA, RIIKKA-JUULIA:                      Suitability of microalgae for biodiesel  
production  
Lipid contents and comparison between  
two extraction methods

Bachelor's Thesis in Environmental Biotechnology, 40 pages

Spring 2015

ABSTRACT

---

Diminishing fossil fuels and increasing energy consumption require development of biomass based fuels. Microalgae are a promising resource of renewable energy because of their rapid growth and high lipid content. Growing them does not require arable land, either.

This study was a part of the ALDIGA project, which examined the potential of microalgae for eco-efficient energy production. The focus of this work was to study the suitability of two microalgae species (*Chlorella sorokiniana* and *Selenastrum sp.*) for biodiesel production. Microalgae were grown in photoreactors and lipids were extracted with two different extraction methods. The methods were compared by yields and thin layer chromatography. The lipids were methylated and fatty acid methyl esters were analyzed using a gas chromatograph mass spectrometer. The results were used to calculate the quality parameters for biodiesel, which were compared with the SFS-EN 14214 standard.

The average biomass growth rate was 40.3 mg/l/d for the *C. sorokiniana* and 71.3 mg/l/d for the *Selenastrum*. The lipid content of *C. sorokiniana* and *Selenastrum* was 15.3 % and 55.2 % and fatty acid content was 4.6 % and 7.9 %, respectively, as determined by using a solvent extraction method. The super-critical fluid extraction results were considerably smaller. The solvent extraction method was found to be more efficient for lipid extraction.

*Selenastrum* fatty acids were found to be more suitable for biodiesel production because cetane number and linolenic acid concentrations of *C. Sorokiniana* fatty acids did not meet the requirements of the standard. Kinematic viscosity in *Selenastrum* was also better than in *C. Sorokiniana*.

Neither species grown under the conditions of the experiment is suitable for biodiesel production because of their insufficient fuel properties and low yield of fatty acids. However, *Selenastrum* seems promising, if the quantity and quality of lipids can be modified by altering growth conditions.

Key words: ALDIGA, microalgae, photobioreactor, biodiesel, fatty acid profile

## SISÄLLYS

1	JOHDANTO	1
2	MIKROLEVIEN LIPIDIKOOSTUMUS	2
2.1	Mikrolevät	2
2.2	Tutkimuskohteet	2
2.3	Mikroleväsolun lipidit	2
2.4	Rasvahapot	3
3	BIODIESELIN TUOTANTOON SOVELTUVAT LIPIDIT JA RASVAHAPOT	6
3.1	Biodieselin tuotantoprosessi vaihtoesteröinnillä	6
3.2	Uusiutuvan dieselin tuotantoprosessi vetykäsittelyllä	7
3.3	Biodieselin laatuvaatimukset	9
4	TUTKIMUSMENETELMIEN KUVAUS	12
4.1	Lipidien uuttomenetelmät	12
4.2	Lipidifraktiointi ohutlevykromatografialla	12
5	MATERIAALIT JA MENETELMÄT	14
5.1	Reaktorikasvatukset	14
5.2	Lipidien uuttaminen	17
5.2.1	Liuotinuutto	17
5.2.2	SFE-uutto	18
5.3	Metylointi ja rasvahappoanalyysit	19
5.3.1	Näytteiden metylointi	19
5.3.2	Rasvahappojot	21
5.4	Polttoaineominaisuudet rasvahappoprofiilien perusteella	22
5.5	Lipidifraktiointi ohutlevykromatografialla	25
6	TULOKSET	27
6.1	Levien kasvu	27
6.2	Ylikriittisen uuton optimoinnin tulokset	28
6.3	Kokonaislipidien ja kokonaisrasvahappojen määrä sekä rasvahappoprofiili liuotin- ja SFE-uutoissa	29
6.4	Polttoaineominaisuudet rasvahappoprofiilin perusteella	32
6.5	TLC	33
7	TULOSTEN TARKASTELU	35



7.1	Uuttomenetelmien vertailu	35
7.2	Mikrolevien vertailu	35
8	JOHTOPÄÄTÖKSET	37
	LÄHTEET	38

## SANASTO JA KÄYTETYT LYHENTEET

SFA	saturated fatty acids, tyydyttyneet rasvahapot
MUFA	monounsaturated fatty acids, kertatyydyttymättömät rasvahapot
PUFA	polyunsaturated fatty acids, monityydyttymättömät rasvahapot
SFE	super-critical fluid extraction, ylikriittinen uutto
TLC	thin layer chromatography, ohutlevykromatografia
FAME	fatty acid methyl esters, rasvahappojen metyyliesterit, biodiesel
HVO	hydrogenated vegetable oil, biopolttoaine, jota tuotetaan käsittelemällä kasviöljyjen tai eläinrasvojen rasvahappoja vedyllä

## 1 JOHDANTO

Fossilisten polttoaineiden vähentyminen, hintojen nousu ja hiilidioksidin määrän kasvu ilmakehässä ovat johtaneet uusiutuvien energiamuotojen laajamittaiseen hyödyntämiseen ja tutkimiseen. Biodieselin tuotantoon on jo pitkään käytetty perinteisiä öljykasveja, kuten öljypalmu ja rypsi. Biodieselin raaka-aineita pidetään hiilidioksidineutraaleina, koska ne vapauttavat palaessaan vain sitomansa hiilidioksidin. Öljykasvit ovat kuitenkin saaneet kritiikkiä, sillä ne vievät arvokasta ruokakasvien viljelysmaata ja kasteluvettä, ja myös kasvuajat voivat olla pitkiä. Mikrolevien käyttö biodieselin raaka-aineena on aiheuttanut laajaa kiinnostusta, sillä ne kasvavat nopeasti, niiden lipidipitoisuus voi olla jopa puolet solun painosta, niitä voidaan kasvattaa jätevesissä, eikä niiden kasvatusta vaadi hehtaareja maa-alueita. Yhdysvalloissa mikrolevistä on jo alettu kahdessa laitoksessa tuottaa biodieseliä ja vielä yksi tuotantolaitos avataan tämän vuoden kuluessa. Mikrolevien lipidipitoisuus ja lipidikoostumus riippuu lajista ja sen kasvuolosuhteista. Siksi onkin tärkeää tutkia eri lajeja, jotta voidaan löytää soveltuvin laji ja kasvatolosuhteet biodieselin valmistamiseksi.

Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli vertailla kahden mikrolevälajin, *Chlorella sorokiniana* ja *Selenastrum sp.*, soveltuvuutta biodieselin tuotantoon lipidikoostumustensa ja rasvahappoprofiiliensa perusteella. Bioreaktorissa kasvatetusta leväbiomassasta uutettiin lipidit kahdella eri menetelmällä, joiden tehoa uuttaa lipidit vertailtiin kvantitatiivisesti ja kvalitatiivisesti. Myös rasvahappokoostumus analysoitiin, jotta uutettujen lipidien soveltuvuutta biodieselin raaka-aineeksi voitiin arvioida. Rasvahappoprofiilin perusteella laskettiin biodieselin laatuparametreja, joita vertailtiin SFS-EN-14214 standardiin. Opinnäytetyö tehtiin osana ALDIGA-projektia (Algae from Wastewater for Combined Bio-diesel and Biogas Production), jonka rahoittajana toimi Tekes.

## 2 MIKROLEVIEN LIPIDIKOOSTUMUS

### 2.1 Mikrolevät

Mikrolevät, eli planktonlevät ovat pääasiassa yhteyttäviä, vesistössä esiintyviä levä. Ne ovat halkaisijaltaan 2 – 100 µm ja esiintyvät yksisoluisina ja yhdyskuntina. Mikrolevät keijuvat vesimassassa tai liikkuvat uintisiimojen avulla. Keijuntaan vaikuttavia tekijöitä ovat solun pinta-ala ja muoto, sukaset, ulokkeet, kaasurakkulat, rasvapisarat ja yhdyskuntien muoto. Mikrolevät jaetaan kasviplanktonsystematiikan mukaan syanobakteereihin (*Cyanophyta*), nieluleviin (*Cryptophyta*), panssarileviin (*Dinophyta*), tarttumaleviin (*Haptophyta*), kulta- ja piileviin (*Chromophyta*), silmäleviin (*Euglenophyta*) ja viherleviin (*Chlorophyta*). (Autio 2011, 4, 5, 10.) Mikrolevät ovat pääasiassa autotrofeja eli yhteyttäviä. Yhteyttämisessä levä syntetisoi hiilidioksidia, vettä ja epäorgaanisia yhdisteitä auringonvalon avulla orgaaniseksi aineeksi. Jotkin levälajit ovat heterotrofisia, eli ne tarvitsevat orgaanista hiiltä. Tästä välimuoto on miksotrofinen levä, joka hiilidioksidin lisäksi voi käyttää myös orgaanista hiiltä. (Hällfors & Saloniemi 2014.)

### 2.2 Tutkimuskohteet

Tässä työssä tutkittiin mikrolevälajeja *Chlorella sorokiniana* ja *Selenastrum* sp. (SCCAP K-188). Sirppimäinen viherlevä *Selenastrum* on eristetty vuonna 2008 humuspitoisesta Iso-Ruuhijärvestä, eikä sitä ole tunnistettu lajitasolle asti. Pyöreä, halkaisijaltaan 2-8 µm viherlevä *Chlorella sorokiniana* (UTEX 1230) hankittiin Texasin yliopiston kantakokoelmasta.

### 2.3 Mikroleväsolun lipidit

Lipideiksi luokitellaan kaikki biologiset molekyylit, jotka liukenevat orgaaniseen liuottimeen. Tämän vuoksi lipidit ovat laaja joukko yhdisteitä, joista vain osa sopii biodieselin valmistukseen. Mikrolevien lipidituotto ja lipidiluokat ja rasvahappokoostumus eroavat merkittävästi lajista toiseen. Niihin vaikuttavat myös kasvatusolosuhteet. Lipidien määrä kuiva-ainetta kohti vaihtelee viidestä

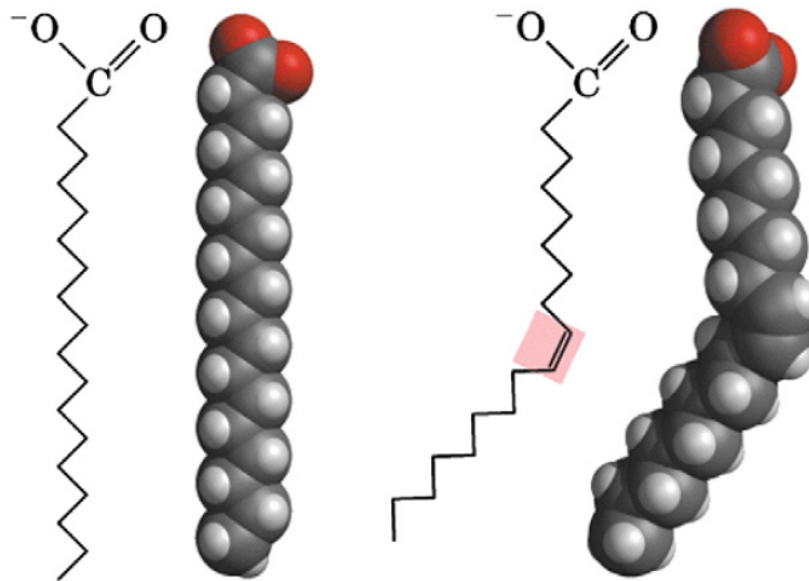
kahdeskaankymmeneen prosenttiin. Leväsolu sisältää erilaisia lipidejä, joilla on eri merkitys solussa. (Halim, Danquah & Webley 2012, 711.)

Lipidit voidaan jakaa kahteen kategoriaan niiden polaarisuuden perusteella; neutraalilipidit ja polaariset lipidit. Neutraalilipideihin luokitellaan mm. asyyllilipidit ja vapaat rasvahapot. Asyyllilipidit rakentuvat glyserolirungosta, johon on sitoutunut yksi, kaksi tai kolme rasvahappoa. Ne nimetään mono- di ja triglyserideiksi glyserolirunkoon sitoutuneitten rasvahappoketjujen määrän mukaan. Asyyllilipidit toimivat solussa pääasiassa energiavarastoina. Neutraalilipideihin luokitellaan myös hiilivedyt, sterolit, ketonit ja pigmentit, mutta näitä molekyylejä ei voida muuttaa biodieseliksi. Polaarisiin lipideihin kuuluvat fosfolipidit ja glykolipidit. Fosfolipidi on molekyyli, jossa glyserolirunkoon on rasvahappojen lisäksi sitoutunut fosfaattiryhmä. Glykolipidit ovat lipidejä, joihin on sitoutunut hiilihydraatti. Polaariset lipidit muodostavat solun monikerroksisen solukalvon. (Halim ym. 2012, 711.)

Leväsolujen lipidirakenteeseen ja määrään vaikuttavat lajin lisäksi myös kasvatusolosuhteet. Näitä ovat kasvatusliuos, lämpötila, valon määrä, valosyklin pituus ja ilmastus. Jos mikrolevä kerätään kasvun stationäärivaiheessa, se sisältää suhteessa vähemmän polaarisia lipidejä kuin logaritmisessa vaiheessa kerätty levämassa. (Halim ym. 2012, 711.)

## 2.4 Rasvahapot

Rasvahappomolekyyli koostuu hydrofobisesta hiilivetyketjusta, jonka päässä on hydrofiilinen karboksyyli-ryhmä. Kuviossa 1 esitellään rasvahapon rakenne. Rasvahapot nimetään sen mukaan, kuinka monta hiiltä on hiiliketjussa ja kuinka monta kaksosidosta rasvahappo sisältää. Jos rasvahapossa ei ole kaksosidoksia, se on tyydyttynyt rasvahappo. Jos kaksosidoksia on yksi, rasvahappo on kertatyydyttymätön. Rasvahapon sisältäessä kaksi tai useamman kaksosidoksen on se monityydyttymätön. Kaksosidoksia sisältävä rasvahappo voi olla cis- tai trans- isomeerisessä muodossa, mutta lähes kaikki rasvahapot ovat levissä cis-muodossa. (Halim ym. 2012, 710-711.)



KUVIO 1. Rasvahappojen rakenne. Vasemmalla on tyydyttynyt rasvahappo C18:0 eli steariinihappo ja oikealla on kertatyydyttymätön rasvahappo C18:1c, öljyhappo. (Halim ym. 2012, 711)

Talulukossa 1 esitellään yleisimmät mikrolevissä esiintyvät rasvahapot.

Taulukossa on kunkin rasvahapon systemaattinen nimi, triviaalinimi ja lyhenne.

Lyhenne muodostuu niin, että ensimmäiseksi ilmoitetaan rasvahapon hiiliatomien lukumäärä ja kaksoispisteen jälkeen kaksoissidosten lukumäärä. Tämän perään voidaan vielä ilmoittaa, monennestako hiilestä kaksoissidos alkaa, kun lasketaan siitä päästä, jossa ei ole karboksyyli ryhmää. Cis- tai trans-isomeereja merkitään pienellä c- tai t-kirjaimella lyhenteen perässä. Tässä työssä käytetään rasvahappojen triviaalinimiä.

TAULUKKO 1. Yleisimmät mikrolevien rasvahapot (Jaakkola, 2012, 18)

Systemaattinen nimi:	Triviaalinimi:	lyhenne:
<i>Tyydyttyneet rasvahapot</i>		
dekaanihappo	kapriinihappo	10:0
dodekaanihappo	lauriinihappo	12:0
tetradekaanihappo	myristiinihappo	14:0
heksadekaanihappo	palmitiinihappo	16:0
oktadekaanihappo	steariinihappo	18:0
eikosaanihappo	arakidiinihappo	20:0
dokosaanihappo	beheeni happo	22:0
tetrakosaanihappo	lignoseriinihappo	24:0
<i>Kertatyydyttymättömät rasvahapot*</i>		
9-heksadekeeni happo	palmitoleiinihappo	16:1 n-7
9-oktadekeeni happo	öljyhappo	18:1 n-9
11-oktadekeeni happo	vakseeni happo	18:1 n-7
11-eikoseeni happo	gadoleiinihappo	20:1 n-9
13-dokoseeni happo	erukahappo	22:1 n-9
15-tetrakoseeni happo	nervoni happo	24:1 n-9
<i>Monityydyttymättömät rasvahapot*</i>		
9,12-oktadekadieeni happo	linoli happo	18:2 n-6
6,9,12-oktadekatrieeni happo	gammalinoleeni happo	18:3 n-6
9,12,15- oktadekatrieeni happo	alfalinoleeni happo	18:3 n-3
11,14-eikosadieeni happo		20:2 n-6
8,11,14-eikosatrieeni happo	DGLA	20:3 n-6
5,8,11-eikosatrieeni happo	meadi n happo	20:3 n-9
5,8,11,14-eikosatetraeeni happo	arakidoni happo	20:4 n-6
5,8,11,14,17-eikosapentaeeeni happo	EPA	20:5 n-3
7,10,13,16,19-dokosapentaeeeni happo		22:5 n-3
4,7,10,13,16-dokosapentaeeeni happo	DPA	22:5 n-6
4,7,10,13,16,19-dokosaheksaeeeni happo	DHA	22:6 n-3
* kaikki kaksoissidokset ovat <i>cis</i> -konfiguraatiossa		

### 3 BIODIESELIN TUOTANTOON SOVELTUVAT LIPIDIT JA RASVAHAPOT

Lipideistä parhaiten biodieselin valmistukseen soveltuvat asyyllilipidit, etenkin triglyseridit. Tämä johtuu siitä, että biodieselin valmistukseen käytettävä katalyyttinen vaihtoesteröinti toimii parhaiten glyserolirungon sisältäville glyserideille ja on melko tehoton polaarille lipideille ja vapaille rasvahapoille. Lisäksi glyserideihin sitoutuneilla rasvahapoilla on yleensä vähemmän kaksoissidoksia kuin polaarilla lipideillä, mikä vaikuttaa biodieselin hapettumiseen ja setaanilukuun. Mitä enemmän biodiesel sisältää kaksoissidoksia, sitä alttiimpi se on epätoivotulle hapettumiselle. (Halim ym. 2012, 711.)

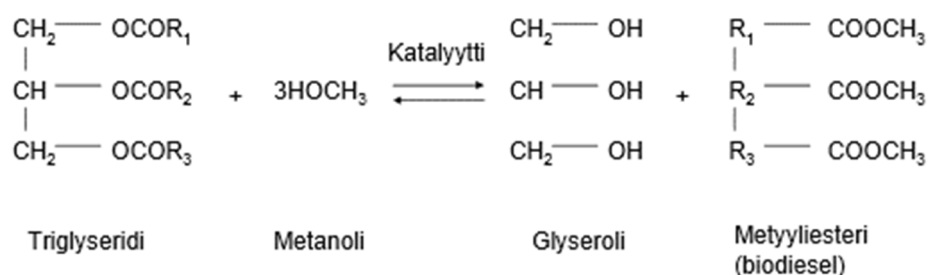
Rasvahappojen rakenteelliset ominaisuudet, kuten hiiliketjun pituus ja haaroittuneisuus ja kaksoissidosten määrä, vaikuttavat biodieselin fysikaalisiin ja kemiallisiin ominaisuuksiin. Mikrolevät sisältävät tyypillisesti rasvahappoja, joiden hiiliketjun pituus on välillä 12 – 22 kappaletta. Levät eivät sisällä rasvahappoja, joissa olisi enemmän kuin kuusi kaksoissidosta, ja tyydyttymättömät rasvahapot ovat lähes aina cis-isomeerisessä muodossa. Vaikka runsas kaksoissidosten määrä tekee biodieselistä herkän hapettumaan, niin cis-isomeeriset rasvahapot, joilla on alle neljä kaksoissidosta, jähmettyvät paljon matalammissa lämpötiloissa kuin tyydyttyneet rasvahapot, jotka lineaarisen rakenteensa vuoksi pakkautuvat lämpötilan laskiessa tiukasti toisiinsa kiinni ja jähmettyvät nopeasti. Käytännössä tämä tarkoittaa, että lineaaristen rasvahappojen kylmänkestävyys on huono. (Halim ym. 2012, 711-712.)

#### 3.1 Biodieselin tuotantoprosessi vaihtoesteröinnillä

Vaihtoesteröintiprosessi on biodieselin nykyisin käytetyin ja kustannustehokkain jalostustapa. Vaihtoesteröinnissä glyserolirunkoon sitoutuneet rasvahapot hydrolysoituvat katalyytin ja lämmön vaikutuksesta, ja niihin sitoutuu alkoholiryhmä, jolloin rasvahaposta tulee rasvahapon metyyliesteri (FAME). Reaktioyhtälö esitellään kuviossa 2, jossa R tarkoittaa rasvahappoketjua. Katalyyttinä käytetään yleensä natrium- tai kaliumhydroksidia ja alkoholina



metanolia. Jos käytetään etanolia, saadaan rasvahappojen etyyliestereitä. (Grönroos 2012, 30–32.)



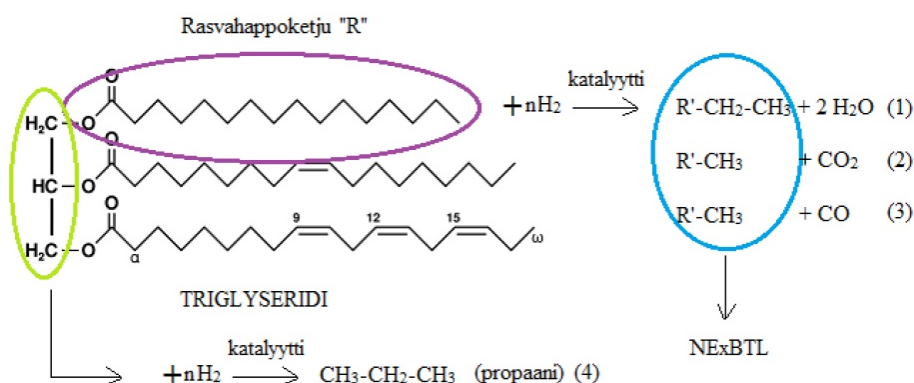
KUVIO 2. Vaihtoesteröinnin reaktioyhtälö. (Chisti 2007, 295)

Esikäsiteltyyn bioöljyyn lisätään alkoholi-katalyyttiseos ja seos kuumennetaan alkoholin kiehumispisteen yläpuolelle reaktion nopeuttamiseksi. Reaktio on tasapainoreaktio, eli yhtä triglyseridimoolia kohti tarvitaan kolme moolia alkoholia, joista muodostuu yksi mooli glyserolia ja kolme moolia metyyliestereitä. Jotta biodiesel olisi SFS-EN 14214 standardin mukaista, siitä on vielä poistettava reagoimattomat triglyseridit, glyseroli, katalyytti, reagoimaton alkoholi, vesi, katalyytin ja veden muodostava saippua ja vapaat rasvahapot. FAME-tyyppinen biodiesel on täysin biohajoavaa ja herkästi hapettuvaa, joten se hajoaa noin neljä kertaa nopeammin kuin fossiiliset polttoaineet. Sen kylmänkestokaan ei pärjää perinteiselle dieselille, tosin lisäaineilla voidaan hieman parantaa sitä. Sellaisenaan se ei sovellu liikennepolttoaineeksi, mutta sitä lisätään dieseliin. (Grönroos 2012, 30–32.)

### 3.2 Uusiutuvan dieselin tuotantoprosessi vetykäsittelyllä

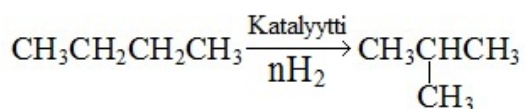
Vetykäsittely on öljy-yhtiö Neste Oilin patentoiman NexBTL-dieselin (Next Generation Biomass to Liquid) valmistusmenetelmä. Vetykäsiteltyä uusiutuvaa dieseliä kutsutaan yleisesti myös nimellä HVO (hydrogenated vegetable oil). NexBTL-dieselin valmistukseen soveltuvat minkä tahansa kasvin öljy sekä eläinrasvat. Raaka-ainevalinta ei vaikuta valmiin dieselin koostumukseen. Valmis diesel on hapetonta ja vastaa koostumukseltaan fossilista dieseliä. Valmistukseen tarvitaan kaksi reaktiota. Ensimmäinen on vetykäsittely ja toinen on isomerointi. Valmistus alkaa esikäsitelyllä, jossa prosessille haitalliset aineet, kuten metallit ja

fosfori poistetaan. Tähän käytetään fosforihappo-, lipeä- ja vesipesua. Puhdistettu raaka-aine siirretään hydrausreaktoriin, jossa öljystä ja rasvasta muodostetaan n-parafiineja, eli suoraketjuisia tyydyttyneitä hiilivetyjä vetykäsittelyn avulla. Vetykäsittely tehdään 300–350 asteen lämpötilassa ja 500 kPa:n paineessa. Reaktioon lisätään vetyä ja katalyyttinä käytetään nikkeli-molybdeenikatalyyttipatjoja. Reaktio tapahtuu kuvion 3 osoittamalla tavalla. (Grönroos 2012, 34–36.)



KUVIO 3. Vetykäsittelyn reaktioyhtälö. (NExBTL 2006, 4)

Triglyseridit sisältävät 11 prosenttia happea, joka poistuu reaktiossa vapauttaen vettä, hiilidioksidia ja hiilimonoksidia. Sivutuotteena ei muodostu glyseroleja, kuten vaihtoesteröinnissä vaan propaania, joka voidaan käyttää polttokaasuna ja ohjata muihin prosesseihin. Rasvahappojen kaksoissidokset poistuvat reaktiossa, jonka ansiosta niiden setaaniluku kasvaa lähes sataan, koska tyydyttyneiden rasvahappojen setaaniluku on suurempi kuin tyydyttymättömien. Setaaniluvulla kuvataan, kuinka nopeasti polttoaine syttyy sen syötön jälkeen. Seuraavaksi n-parafeenit isomeroidaan. Isomerointi tarkoittaa sitä, että hiilivedyn molekyylipaino pysyy samana, mutta rakenne muuttuu. Reaktioyhtälö on kuvattu kuviossa 4. Isomerointi tapahtuu samoissa lämpötiloissa ja paineessa kuin vetykäsittelykin ja reaktioon lisätään vetyä ja katalyyttiä. Isomeroinnin seurauksena suoraketjuinen n-parafeeni muuttuu haaroittuneeksi metyylihaarojen ansiosta ja samalla lyhenee. (Grönroos 2012, 34–36.)



KUVIO 4. Isomerointireaktion reaktioyhtälö.

Isomeroinnin ansiosta NexBTL-dieselin kylmänkesto paranee ja sellaisenaan se kestää 5- 30 asteen pakkasen. Lisäaineilla pakkasenkesto paranee jopa -44 asteeseen. Jälkikäsitellyssä tuote stabiloidaan ja polttokaasu- ja bensiinijakeet erotellaan höyrystrippauksella. Lopuksi tuote kuivataan. (Grönroos 2012, 34–36.)

### 3.3 Biodieselin laatuvaatimukset

FAME-tyyppiselle biodieselille määrättiin EU:ssa vuonna 2004 laatuvaatimukset standardilla EN 14214, ja se hyväksyttiin Suomen standardisoimisliitossa (SFS) sellaisenaan, jolloin sen kansalliseksi tunnukseksi tuli SFS-EN 14214. Standardi sisältää 26 laatuparametria, joiden raja-arvot biodieselin tulee täyttää.

Standardissa on yhteneviä parametreja fossiilisen dieselpolttoaineen standardin EN 590 kanssa, mutta lisäksi se sisältää parametreja, jotka kuvaavat metyyliestereiden ominaisuuksia. (Bionova Engineering 2007, 8,19.) Standardi koskee vain FAME-biodieseliä eikä vetykäsittellylle HVO-tyypin biodieselille ole standardia, sillä EU-direktiivien mukaan HVO ei ole biodieseliä, vaan öljykasveista tai eläinrasvoista vetykäsittelyprosessilla valmistettua synteettistä polttoainetta, parafiinista dieseliä (Öljyalan keskusliitto 2014).

Standardin lisäksi FAME-dieselin laatua määrittää EU:n polttoainedirektiivi 98/70/EY. Direktiivissä määritetään, paljonko fossiilidiesel saa maksimissaan sisältää FAME-biodieseliä, jotta se vielä täyttää EN 590 standardin raja-arvot. Erityisesti dieselin tiheysvaatimus standardissa EN 590 rajoittaa FAMEn osuutta dieselissä. Tällä hetkellä fossiilidiesel saa sisältää 7 tilavuusprosenttia biodieseliä, mutta EU:n komissio on antanut Euroopan standardisoimiskomitealle (CEN) mandaatin lisätä sallittu biodieselpitoisuus fossiilidieselissä 10 %:iin muuttamalla standardia EN 590. (Bionova Engineering 2007, 23.) Sen sijaan HVO-tyypin biodieselin osuutta ei ole rajoitettu direktiivissä, koska se on kemialliselta koostumukseltaan fossiilidieselin kaltaista (Öljyalan keskusliitto 2014).

Taulukossa 2 esitellään SFS-EN 14214 standardin sisältämät laatuparametrit. Standardi määrittelee parametreille raja-arvot, jotka biodieselin on täytettävä, sekä niiden määrittämiseksi testausmenetelmät, jotka ovat myös standardisoituja.

TAULUKKO 2. Standardin SF-EN 14214 laatuvaatimukset ja niiden raja-arvot (Suomen Standardisoimisliitto SFS, 2004).

Parametri	Yksikkö	Testausmenetelmä	Raja-arvo EN 14214
Ester content, esteripitoisuus	%(m/m)	EN 14103	≥ 96.5
Density at 15°C, tiheys	kg/m <sup>3</sup>	EN ISO 3675	860 – 900
Viscosity at 40°C, viskositeetti	mm <sup>2</sup> /s	EN ISO 3104	3.50 – 5.00
Flash point, leimahduspiste	°C	ISO/DIS 3679	≥ 120
Sulfur content, rikki-pitoisuus	mg/kg	EN ISO 20846	≤ 10.0
Carbon residue , tislaujäännös	%(m/m)	EN ISO 10370	≤ 0.3
Cetane number, setaaniluku	-	EN ISO 5165	≥ 51.0
Sulfated ash content, tuhkapitoisuus	%(m/m)	ISO 3987	≤ 0.02
Water content, vesipitoisuus	mg/kg	EN ISO 12937	≤ 500
Total contamination, kokonaiskontaminaatio	mg/kg	EN 12662	≤ 24
Copper strip corrosion, kuparikorroosiotesti (3 h, 50 °C)	-	EN ISO 2160	Luokka 1
Oxidation stability, 110°C, hapetuksen kestävyys	Tuntia, h	EN 14112	≥ 6.0
Acid value, happoluku	mgKOH /g	EN 14104	≤ 0.50
Iodine value, jodiluku	g/100 g	EN 14111	≤ 120
Linolenic acid methyl ester, linoleenihapon metyyliesteri	%(m/m)	EN 14103	≤ 12.0
Polyunsaturated (≥4 double bonds) methyl ester, monityydyttymättömät kaksoissidokset (yli 4 kaksoissidosta)	%(m/m)	ei vielä virallista standardia	≤ 1
Methanol content, metanolipitoisuus	%(m/m)	EN 14110	≤ 0.20
Monoglyceride content, monoglyseridipitoisuus	%(m/m)	EN 14105	≤ 0.80
Diglyceride content, diglyseridipitoisuus	%(m/m)	EN 14105	≤ 0.20
Triglyceride content, triglyseridipitoisuus	%(m/m)	EN 14105	≤ 0.20
Free glycerol, vapaa glyseroli	%(m/m)	EN 14105	≤ 0.02
Total glycerol, kokonaisglyseroli	%(m/m)	EN 14105	≤ 0.25
Group I metals (Na+K), maametallit	mg/kg	EN 14538	≤ 5.0
Group II metals (Ca+Mg), maa-alkalimetallit	mg/kg	EN 14538	≤ 5.0
Phosphorus content, fosforipitoisuus	mg/kg	EN 14107	≤ 10.0
CFPP, suodatettavuuden rajalämpötila	°C	EN 116	useita

Leimahduspiste on lämpötila, jossa polttoaineen haihtumisen seurauksena sen yläpuolinen kaasu-ilmaseos syttyy palamaan ulkoisen syttymislähteen vaikutuksesta. Setaaniluku kertoo, kuinka lyhyt viive on polttoaineen syötön ja palamisreaktion välillä. Mitä suurempi setaaniluku on, sitä nopeammin polttoaine syttyy syötön jälkeen. Tuhkapitoisuus tarkoittaa epäorgaanista ainesta, joka jää jäljelle, kun tuotetta poltetaan. Kokonaiskontaminaatio tarkoittaa tuotteessa olevaa kiinteää ainetta, joka jää  $0,8\text{ }\mu\text{m}$  suodattimeen. Hapetuksen kestävyys määrittää, kuinka kauan polttoaine sietää  $110$  asteen lämpötilaa, ennen kuin havaitaan haihtuvia happoja. Arvo kuvaa, onko polttoaine herkästi hapettuvaa liiallisten monitydyttymättömien rasvahappojen takia ja näin ollen huono säilymään. Happoluku mittaa käytännössä biodieselin sisältämien vapaiden rasvahappojen määrää. Vapaita rasvahappoja irtoaa metyyliesteristä ajan myötä, mikä kasvattaa happolukua. Jodiluku, eli tyydyttymättömyysaste on suoraan verrannollinen kaksoissidosten määrään polttoaineessa. Se vaikuttaa viskositeettiin, setaanilukuun ja säilyvyyteen. Kaksoissidokset pienentävät viskositeettia, mutta samalla ei-toivotusti setaanilukua. Suodatettavuuden rajalämpötila kuvaa polttoaineen kylmänkestävyyttä ja on se lämpötila, jossa diesel lakkaa valumasta standardinmukaisen suodattimen läpi, kun sitä jäähdytetään. (Bionova Engineering 2007, 21.)

## 4 TUTKIMUSMENETELMIEN KUVAUS

### 4.1 Lipidien uutomenetelmät

Leväsoluista uutettiin lipidit käyttäen kahta eri uutomenetelmää: liuotinuuttoa kloroformi-metanoli-liuottimella ja ylikriittistä uuttoa (SFE, supercritical fluid extraction). Liuotinuutossa valitun liuottimen poolisuus vaikuttaa uuttotulokseen. Menetelmiä valittiin kaksi, koska ne uuttavat eri komponentteja solusta. Liuotinuutto valituilla liuottimilla uuttaa neutraalilipidien myös poolisemmat lipidit, kuten fosfolipidit, glykolipidit ja pooliset pigmentit. Ylikriittinen uutto puolestaan uuttaa pääasiassa neutraalilipidejä. Tässä työssä liuotinuuttoa tehostettiin sonikoimalla biomassaa solujen hajottamiseksi. Reagenssit ja olosuhteet pidettiin mahdollisimman kylminä jäiden avulla entsyymiaktiivisuuden minimoimiseksi, ja uuttoputket suljettiin typpivirran alla typpi-ilmakehän luomiseksi, mikä estää rasvahappojen hapettumisen. Ylikriittisessä uutossa soluja ei hajotettu, eikä liuottimia käytetty.

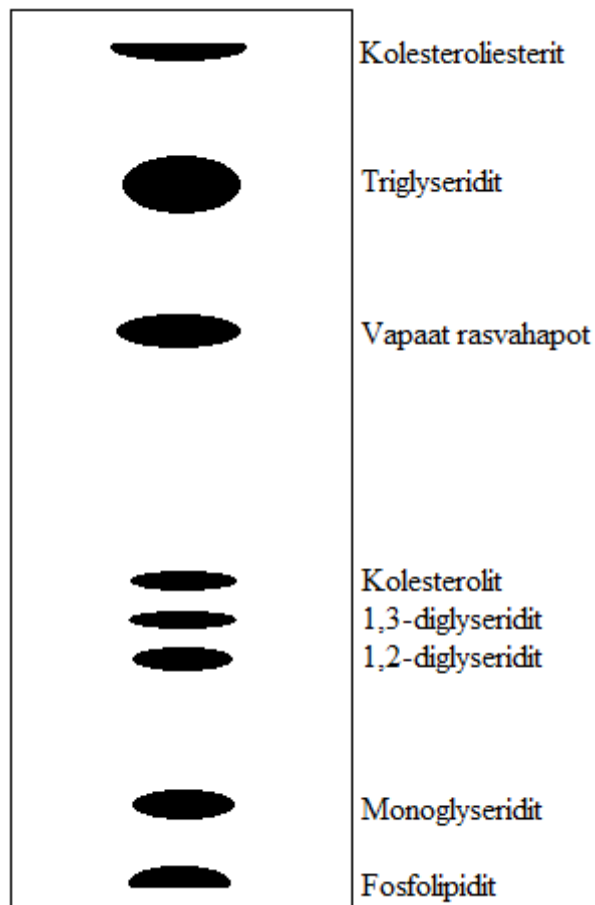
Ylikriittinen uutto perustuu paineistettuun kaasuun, joka paineen ja siten tiheyden kasvun seurauksena saavuttaa ylikriittisen pisteen. Tässä pisteessä uuttokaasu saa sekä nesteen, että kaasun ominaisuudet, minkä seurauksena se muuttuu hyväksi liuottimeksi. (Sirén, Perämäki & Laiho 2009, 330; Herrero, Cifuentes & Ibanez 2006, 137.) Uuton tehokkuutta voidaan parantaa säätämällä kaasun lämpötilaa, painetta ja uuttoaikaa (Herrero ym. 2006). Yleisimmin uutossa käytetty kaasu on hiilidioksidi, koska se on myrkytöntä ja edullista (Sirén ym. 2009).

### 4.2 Lipidifraktiointi ohutlevykromatografialla

Ohutlevykromatografian erottelukyky perustuu kiinteään faasin ja liukoisen faasin vuorovaikutukseen. Kiinteä faasi, eli silika-geelillä päällystetty levy on ominaisuuksiltaan poolinen. Näyte pipetoidaan levyn alalaitaan ja levy asetetaan pystyyn kammioon, jonka pohjalla on ajoliuos. Ajoliuoksessa on poolisuudeltaan erilaisia liuoksia, joiden avulla erotellaan poolisuudeltaan erilaisia yhdisteitä. Kapillaarivoimien avulla ajoliuos alkaa nousta levyä pitkin, kunnes se saavuttaa ylälaidan. Näytteen poolisimmat komponentit jäävät levyn alalaitaan ja

poolittomimmat komponentit kipuavat ajoliuksen mukana levyn ylälaitaan. Ajoliuksen valinnalla voidaan vaikuttaa komponenttien erottumiseen. (Christie & Han 2010, 21, 23, 72.)

Kuviossa 5 esitetään rakennekuva lipidiluokkien eluoitusjärjestyksestä. Rakennekuvassa kiinteänä faasina on silika-geeli ja ajoliuksena petroolieetteri:dietyylieetteri:etikkahappoeluentti (80:20:2). Poolisimmat fosfolipidit jäävät levyn alalaitaan, ja mitä poolittomammaksi lipidiluokat menevät, sitä ylemmäs ne kiipeävät levyllä. Luokat tunnistetaan samalle levyille aplikoitujen standardiaineiden avulla. (Christie & Han 2010, 72.)



KUVIO 5. Rakennekuva lipidiluokkien eluoitusjärjestyksestä (Christie & Han 2010, 72).

## 5 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 5.1 Reaktorikasvatukset

Tässä työssä käytetty mikroleväbiomassa tuotettiin fotobioreaktoreissa Helsingin yliopiston ympäristötieteiden laitoksella. *Chlorella sorokiniana* ja *Selenastrum sp.* kasvatuksissa kasvatusliuoksena käytettiin modifioitua COMBO-liuosta (Killham, Kreeger, Lynn, Goulden, & Herrera 1998, 148–149). Liuos valittiin aikaisempien kokeiden perusteella. Kasvatusliuosta modifioitiin lisäämällä typen lähdettä natriumnitraattia ja fosforin lähdettä kaliumfosfaattia, jotta ravinteiden määrä ei rajoittaisi kasvatuksia. Typeä lisättiin 14-kertainen määrä ja fosforia 10-kertainen määrä alkuperäiseen ohjeeseen verrattuna.

*C. sorokiniana* kasvatettiin 200 litran reaktorissa. Reaktorin kuva on kuviossa 6. Kasvatusliuosta oli reaktorissa 180 litraa. Reaktorin valaistuksessa käytettiin loisteputkivalaisimia (16 X 36 W Osram Lumilux 954). Kasvatuksessa valo:pimeäsykli oli 16:8. Reaktorin sekoitukseen ja ilmastukseen käytettiin rei'itettyä putkea reaktorin pohjalla, johon johdettiin pumpulla ilmaa. Reaktoriin syötettiin hiilidioksidia silikoniputkea pitkin, jonka päässä oli 0,5 µm huokoskoon ilmastuskivi. Reaktorin pH mitattiin pHT-elektrodilla (SI-Analytics, 425 mm), joka oli kytkettynä multiparametrilaitteeseen KM 300. Hiilidioksidinsyöttöä kontrolloitiin pH-arvon avulla siten, että kun pH ylitti arvon 7, hiilidioksidinsyöttö kytkeytyi päälle ja loppui kun pH laski taas alle seitsemän. *Selenastrum sp.* kasvatettiin pienemmässä 100 litran bioreaktorissa, jonka ilmastus, valaistus ja hiilidioksidinsyöttö toteutettiin samoin kuin suuremmassakin reaktorissa. Kasvatustilavuus oli 80 litraa.





KUVIO 6. 200 litran fotobioreaktori

Levämassan kasvua seurattiin sameuden ja kuivapainon avulla. Reaktorista otettiin säännöllisesti näyte, josta tehtiin kolme rinnakkaista suodatusta kuivapainon seuraamiseksi. Leväliuos suodatettiin kuivatulla (105 °C, 4 h) ja esipunnitulla lasikuitusuodattimella (GF/C, halkaisija 47 mm, Whatman) ja suodatin huuhdeltiin 20 ml tislattulla vedellä. Levämassa jäi suodattimeen, joka kuivattiin (105 °, 4 h) ja punnitiin uudelleen. Punnituseron ja pipetoidun liuosmäärän perusteella laskettiin kuivapaino kaavan 1 mukaan. (Tredici & Zittelli 1997, 190).

KAAVA 1. Näytteen kuivapainon laskeminen

$$dw = \frac{m_{n+s} - m_s}{V} * 1000$$

dw = näytteen kuivapaino (g/l)

$m_{n+s}$  = näytteen ja suodattimen yhteispaino (g)

$m_s$  = suodattimen paino (g)

$V$  = Suodattimen läpi pipetoitu näytemäärä (ml)

Kuivapainotuloksista saatiin kummallekin lajille kasvukäyrä, jonka perusteella valittiin kasvun eksponentiaalinen vaihe. Tästä vaiheesta laskettiin spesifinen kasvunopeus ( $SGR$  = specific growth rate,  $d^{-1}$ ), joka lasketaan kaavalla 2. Siinä eksponentiaalisen kasvun loppukonsentraation ja alkukonsentraation osamäärän luonnolinen logaritmi jaetaan eksponentiaaliseen kasvuun kuluneella ajalla. Saatu arvo kertoo kuinka monta kertaa solumäärä tai solumassa kahdentuu yhden vuorokauden aikana.

Kaava 2. Spesifinen kasvunopeus (Goswami, Kalita & Kalita 2012, 503).

$$\mu = \ln\left(\frac{N_t}{N_o}\right) / (T_t - T_o)$$

$\mu$  = spesifinen kasvunopeus

$N_t$  = eksponentiaalisen kasvun loppukonsentraatio

$N_o$  = eksponentiaalisen kasvun alkukonsentraatio

$T_t$  = loppukonsentraatiota vastaava aika vuorokausina

$T_o$  = alkukonsentraatiota vastaava aika vuorokausina

Reaktorien levämassa otettiin talteen, kun kasvu saavutti stationäärivaiheen. *Chlorella sorokiniana* kerättiin flokkuloimalla levämassa kitosaanin avulla reaktorin pohjalle, josta se pumpattiin kanistereihin. Tämän jälkeen massa konsentroidiin sentrifuugamalla (Multifuge 1 S-R Kendro, Germany). *Selenastrum* sp. kerättiin talteen käyttämällä siihen suunniteltua Evodos type 10 sentrifugia. Keräysmenetelmät eroavat toisistaan, koska Evodos type 10-sentrifugi ei vielä ollut, kun *C. sorokiniana* kasvatettiin. Konsentroidu levämassa säilöttiin syväjäähän (-70 °C) odottamaan lipiduuuttoa.

## 5.2 Lipidien uuttaminen

Jäiset levänäytteet käsiteltiin uutoja varten kylmäkuivaustekniikalla käyttäen kuivuria Christ alpha 1-4 B Braun Biotech International. Lipidit uutettiin käyttäen kahta eri uuttomenetelmää: liuotinuuttoa ja ylikriittistä uuttoa. Näillä uuttomenetelmillä tehtiin kolme rinnakkaista uuttoa kummastakin levälajista.

Tulokset laskettiin kokonaislipidi- ja kokonaisrasvahappopitoisuuksina (% kuivapainosta). Kokonaislipidipitoisuus määritettiin gravimetrisesti, eli putket, joihin lipidit uutettiin, punnittiin ensin tyhjinä ja uudestaan uutojen jälkeen. Painojen erotuksesta saatiin selville, kuinka paljon näytteestä uutui lipidejä. Näistä lipideistä analysoitiin rasvahapot, joiden yhteen lasketusta määrästä saatiin rasvahappojen kokonaismäärä näytteissä.

### 5.2.1 Liuotinuutto

Liuotinuutto tehtiin Parrishin (1990, 8-9) menetelmän pohjalta, mutta sitä modifioitiin soveltumaan suuremmille näytemäärille lisäämällä liuottimen ja deionisoidun veden määrää.

Kuivattua levänäytettä punnittiin noin 10 mg esipunnittuihin Kimax-putkiin, joiden tilavuus oli 10 ml. Näytteistä tehtiin kolme rinnakkaista uuttoa. Uuttoputket kuumennettiin ennen uuttoa (4 h, 450 °C) orgaanisten epäpuhtauksien poistamiseksi. Putkiin lisättiin 8 ml jäissä ollutta kloroformi-metanoli-liuosta (2:1) ja 1 ml deionisoitua vettä. Putket suljettiin typpivirran alla ja laitettiin 10 minuutiksi sonikaattoriin (Branson 8510 Bransonic, USA), jossa oli jäitä. Tämän jälkeen putkia vorteksoitiin (Reax 2000 Heidolph, Germany) minuutin ajan ja sentrifugoitiin (Multifuge 1 S-R Kendro, Germany) 3000 rpm 3 minuuttia. Alempi faasi, joka sisälsi uuttuneet lipidit, siirrettiin toiseen putkeen kaksoispipetointimenetelmää käyttäen. Siinä lyhyt pasteur-pipetti laitetaan alafaasiin putken pohjalle kevyesti tutista puristaen, jotta pipetin sisälle ei pääse levämassaa. Tämän jälkeen tutti irrotetaan ja lyhyen pipetin kautta pipetoidaan pitkällä pasteur-pipetilla alafaasi uuteen putkeen. Pipetoinnissa käytetyt pasteur-pipetit huuhdeltiin noin 3 millilitralla kloroformia niin, että kloroformi valutettiin alkuperäiseen levänäyteputkeen. Kloroformiuutteen sisältävät putket laitettiin

haihtumaan typpivirran alle ja levänäytteen sisältävät putket sonikoitiin, vorteksoitiin ja sentrifugattiin uudelleen kuten edellä. Tämän jälkeen alafaasi pipetoitiin samaan putkeen, johon aiempi uute siirrettiin ja huuhdottiin pipetit kloroformilla alkuperäiseen putkeen. Uutto tehtiin vielä kolmannen kerran, jolloin liuos oli kirkas ja kaikki lipidit oli uutettu. Lipidien koontiputki haihdutettiin typpivirran alla kuivaksi, punnittiin ja laitettiin -20 °C odottamaan lipidien fraktiointia ja metylointia.

### 5.2.2 SFE-uutto

Ylikriittinen uutto tehtiin laitteistolla ISCO ORDIOR SFX<sup>TM</sup> 3560, USA ja Syringe Pump MODEL 260D, USA Helsingin yliopiston kemian laitoksella Helsingissä. Uuttokaasuna käytettiin heliumpaineistettua 5,2-laatuista hiilidioksidia, eli kaasun puhtaus oli 99,9992 %.

Menetelmä aloitettiin uuton optimoinnilla, koska ei tiedetty millaiset parametrit vaadittaisiin parhaan uutotuloksen saamiseksi kummastakin levälajista. Paine, hiilidioksidin virtausnopeus ja paineenrajoittimen lämpötila pidettiin vakioina. Arvot näkyvät taulukossa 3. Optimointi suoritettiin muuttamalla kahta parametria; uuttolämpötilaa ja uuttoaikaa. Lämpötilan ja ajan parametrit ovat esiteltynä lajikohtaisesti taulukossa 4 niin, että lajin alla näkyvät lämpötila ja siinä tehdyt uuttojen pituudet minuutteina.

TAULUKKO 3. Ylikriittisen uuton vakioparametrit

Vakioparametrit	
Paine	500 ATM
CO <sub>2</sub> virtausnopeus	1,5 ml/min
paineenrajoittimen °C	60 °C

TAULUKKO 4. Ylikriittisen uuton lämpötilat ja uuttoajat

<i>Chlorella sorokiniana</i>		<i>Selenastrum sp.</i>	
lämpötila (°C)	aika (min)	lämpötila (°C)	aika (min)
60	30, 60, 120	40	30, 60
80	30, 60, 120	60	30, 60, 120, 180
		80	60, 120, 180, 240

Optimoinnin alkuvaiheessa huomattiin, että vaikka lipidit uuttuivat näytteestä, ne eivät päätyneet keräysputkeen, vaan tarttuivat kapillaariin. Tämän takia laitteisto ohjelmoitiin niin, että se syötti uuton alussa 2 millilitraa heksaania ja uuton aikana kolmen minuutin välein 0,5 millilitraa heksaania putkistoon, jonka kautta uuttuneet lipidit siirtyivät keräysputkeen. Uuton lopussa laitteisto syötti vielä 10 millilitraa heksaania putkistoa pitkin. Tämän seurauksena uutetut lipidit pääsivät suurimmaksi osaksi keräysputkeen asti, mutta hiilidioksidin virtaus haihdutti heksaanin niin nopeasti, ettei se ehtinyt valua keräysputkeen. Siksi päädyttiin vielä lisäämään 15 millilitraa heksaania manuaalisesti ajon jälkeen putkiston läpi hiilidioksidin syötön ollessa suljettuna, jolloin heksaani kulkeutui kapillaarin läpi keräysputkeen liuottaen viimeisetkin kapillaariin tarttuneet lipidit mukanaan.

Ennen SFE-ajoa uuttoputket hehkutettiin 450 asteessa neljä tuntia orgaanisten epäpuhtauksien poistamiseksi ja punnittiin gravimetrista määritystä varten. Näytteet punnittiin SFE-laitteiston uuttokammioihin. *C. sorokiniana*a punnittiin noin 0,5 grammaa ja *Selenastrum*-kanta noin 0,3 grammaa. *Selenastrumia* punnittiin vähemmän, koska runsaampi lipidien uuttuminen olisi suuremmalla näytemäärällä tukkinut laitteiston. Levää uutetiin aluksi 30 minuuttia, minkä jälkeen esipunnitut uuttoputket punnittiin uudelleen. Ajoaikaa pidennettiin uuttamalla samaa levänäytettä seuraavaksi tunnin ajan uuteen keräysputkeen, joka taas punnittiin. Tätä jatkettiin, kunnes levänäytteestä ei enää uuttunut enempää. Ajon jälkeen putket haihdutettiin kuivaksi, punnittiin uudelleen, suljettiin typpivirran alla ja varastoitiin pakkaseen (-20 °C) odottamaan lipidifraktiointia ja metylointia. Ennen metylointia aiemmissa vaiheissa uutetut lipidit siirrettiin optimaalisimman SFE-uuton putkeen heksaanin avulla.

### 5.3 Metylointi ja rasvahappoanalyysit

#### 5.3.1 Näytteiden metylointi

Näytteet metyloitiin ennen rasvahappoanalyysiä. Liuotinuuton kolmesta rinnakkaisesta näytteestä kaksi metyloitiin. Samalla metyloitiin myös yksi kontrolliputki, eli tyhjä putki, joka käsiteltiin samoin kuin näyteputket. SFE-näytteistä valittiin optimaalisin lämpötila-aika-yhdistelmä, ja sen kolmesta

rinnakkaisesta näytteestä metyloitiin kaksi. *C. sorokinianan* optimaalisin uutto tapahtui asetuksilla 80 °C/120 min. ja *Selenastrum*-kannan asetuksilla 60 °C/180 min.

Näytteiden ja kontrolliputken ohella metyloitiin myös oliiviöljystandardi (Olive oil, Supelco), jonka rasvahappojen suhteelliset prosenttiosuudet tunnetaan. Oliiviöljyllä varmistettiin metylointiprosessin ja rasvahappojen toimivuus ja olosuhteiden stabiilius eri analyysipäivien välillä.

Metylointia varten valmistettiin seuraavat reagenssit: metylointireagenssi rikkihappo-metanoli-liuos (1 %), antioksidantti butyloitu hydroksitolueeni (BHT)-metanoli-liuos (1 %), Natriumkloridi-deionisoitu vesi-liuos (5 %) ja kaliumkarbonaatti-deionisoitu vesiliuos (2 %) (Christie & Han 2010, 147).

Näytteet jaettiin ensin kahtia liuottimen avulla, koska haluttiin varmistaa, että ongelmatapauksissa näyte voitaisiin analysoida uudestaan. Putkiin lisättiin 2 ml heksaania ja jaettiin puoliksi. Toinen osa laitettiin pakkaseen ja toinen haihdutettiin kuivaksi metylointia varten.

Näytteiden metyloimiseksi näyteputkiin pipetoitiin 1 ml tolueenia, 20 µl BHT:tä ja metyloimatonta sisäistä standardia C19:0 (nonadecanoid acid G-F/analytical standard, Sigma Aldrich), jonka konsentraatio oli 6 µg/ml. Sisäistä standardia lisättiin 100 µl SFE-näytteisiin ja 50 µl muihin. Tällöin ennen analyysiä tehtävien laimennusten jälkeen näytteen lopullinen sisäisen standardin pitoisuus oli 3 ng/µl. Putkiin lisättiin vielä 2 ml metylointireagenssia jonka jälkeen ne suljettiin typpivirran alla, vorteksoitiin 30 sekuntia ja inkuboitiin 50 asteen vesihauteessa yön yli. (Christie & Han 2010, 147.)

Seuraavana päivänä putket poistettiin vesihauteesta ja jäähdytettiin huoneenlämpöisiksi. Jäähdytyneisiin putkiin lisättiin 3 millilitraa natriumkloridiliuosta ja 5 millilitraa heksaania. Putket suljettiin typpivirran alla, niitä vorteksoitiin 30 sekuntia ja sentrifugoitiin 2 minuuttia kierrosnopeudella 1500. Putkeen syntyi kaksi faasia, joista ylempi orgaaninen rasvahappojen metyyliesterit sisältävä faasi siirrettiin uuteen puhtaaseen putkeen. Alempaan faasiin lisättiin taas 5 ml heksaania, vorteksoitiin ja sentrifugattiin, minkä jälkeen ylempi faasi

siirrettiin samaan putkeen kuin edellinenkin. Orgaaninen faasi pestiin 3,5 millilitralla kaliumkarbonaattiliuosta, joka faasiutui putken pohjalle. Se poistettiin kaksoispietointitekniikalla. Tämän jälkeen näyte kuivattiin vedettömällä natriumsulfaattijauheella, jota lisättiin näytteeseen spaattelin kärjellinen. Näyte pipetoitiin vielä puhtaaseen putkeen ja haihdutettiin typpivirran alla kuivaksi. Lopuksi näytteeseen lisättiin 1 millilitra heksaania ja tehtiin rasvahappoajoa varten sopivat laimennukset rasvahappoanalyysissä käytettävään ajopulloon. SFE-näytteet laimennettiin 200-kertaisesti ja muut 100-kertaisesti. (Christie & Han 2010, 147.)

### 5.3.2 Rasvahappoajot

Metyloinnin jälkeen näytteet olivat valmiit rasvahappoajoa varten. Metyloidut näytteet analysoitiin kaasukromatografia-massaspektrometrilla (GC-MS Shimadzu QP2010 Ultra). Kolonnin (Agilent Technologies, DB 23) pituus oli 30 metriä, sisähalkaisija 0,250 millimetriä ja stationäärifaasin paksuus kolonnissa oli 0,15 mikrometriä. Kantajakaasuna käytettiin heliumia virtausnopeudella 1,5 millilitraa minuutissa. Ajo-ohjelmassa injektorin lämpötila oli 250 astetta jakolonnin lämpötila alussa 60 astetta. Lämpötila pidettiin 60 asteessa ensimmäisen minuutin ajan, minkä jälkeen lämpötilaa nostettiin 20 astetta minuutissa 110 asteeseen. 110 asteesta 185 asteeseen lämpötilaa nostettiin nopeudella 3 astetta minuutissa, 185 asteesta 195 asteeseen nopeudella 0,5 astetta minuutissa ja 195 asteesta 250 asteeseen nopeudella 25 astetta minuutissa. Lämpötila pidettiin 250 asteessa kahden minuutin ajan.

Rasvahapot identifioitiin vertaamalla retentioaikaa ja massaspektoria 37 eri rasvahappoa sisältävään ulkoiseen kalibrointistandardiin (Supelco<sup>TM</sup> 37 Component FAME Mix, Sigma), johon oli lisätty tulosten kvantitointia varten metyloitua standardia C19:0 (Methyl nonadecanoate, analytical standard, sigma Aldrich) pitoisuudella 6 ng / µl. Rasvahapot kvantitoitiin LabSolutions-ohjelmistolla kaavan 3 mukaan.

KAAVA 3. Kvantitatiivinen määrittäminen standardisuoran ja sisäisen standardin avulla

$$\frac{A_{xs}}{A_{is}} = k * \frac{C_{xs}}{C_{is}} + b$$

$A_{xs}$  = näytteen pinta-ala

$A_{is}$  = sisäisen standardin pinta-ala

$k$  = standardisuoran kulmakerroin

$C_{xs}$  = ratkaistava konsentraatio

$C_{is}$  = sisäisen standardin konsentraatio

$b$  = standardisuoran leikkauspiste

Rasvahappojen pitoisuus suhteutettiin näytteitä varten punnitun kuivatuslevämassan painoon, josta saatiin tietää rasvahappojen määrä näytteen kuivapainoa kohti. Kokonaisrasvahapot saatiin laskemalla kaikki kvantitoidut rasvahapot yhteen. Yksittäisten rasvahappojen prosentuaaliset osuudet saatiin laskemalla kunkin rasvahapon suhteellinen osuus kokonaisrasvahappojen määrästä.

#### 5.4 Polttoaineominaisuudet rasvahappoprofiilien perusteella

Rasvahappoprofiilin perusteella voidaan laskea useita biodieselin laatuparametreja. Näillä laskumenetelmillä tulos ei käytännössä eroa SFS-EN 14214 standardin määrittelemien analyysimenetelmien vastaavista tuloksista. (Ramírez-Verduzco, Rodríguez-Rodríguez & Jaramillo-Jacob 2012, 110.) Tähän työhön valittiin parametrit setaaniluku, viskositeetti, tiheys, linoleenihapon metyyliesterien määrä ja monityydyttymättömien kaksoissidosten määrä (yli 4 kaksoissidosta), koska niiden raja-arvot on määritetty SFS-EN 14214 standardissa ja tuloksia voidaan vertailla sen asettamiin rajoihin.



Jokaisessa laskussa käytetään rasvahapon metyyliesterin molekyylimassaa ( $M_i$ ) (Møller 2011, 1-6) ja rasvahapon metyyliesterin kaksoissidosten määrää ( $N$ ). Kun kaikista näytteen rasvahapoista on laskettu haluttu parametri edellä mainittujen arvojen avulla, summataan parametrit yhteen, jolloin saadaan arvo, jossa on huomioitu koko näytteen rasvahappokoostumus. Summauksessa otetaan huomioon jokaisen rasvahapon metyyliesterin osuus kokonaismäärästä. Osuus sijoitetaan kaavaan desimaalukuna.

Setaaniluku voidaan laskea kullekin rasvahapon metyyliesterille kaavalla 4 ja rasvahapoille kokonaisuudessaan näytteessä rasvahappoprofiilin perusteella kaavalla 5.

KAAVA 4. Setaaniluvun määrittäminen yksittäiselle rasvahapon metyyliesterille (Ramírez-Verduzco ym. 2012, 104).

$$CN_i = -7,8 + 0,302 * M_i - 20 * N$$

$CN_i$  = i:n rasvahapon setaaniluku

$M_i$  = i:n rasvahapon molekyylimassa (g/mol)

$N$  = kaksoissidosten määrä rasvahapossa

KAAVA 5. Setaaniluvun määrittäminen koko profiilille (Ramírez-Verduzco ym. 2012, 110).

$$CN = \sum_{i=1}^n w_i * CN_i$$

$CN$  = Cetane number, setaaniluku koko profiilille

$w_i$  = i:n rasvahapon suhde kokonaisrasvahappoihin

Kinemaattisen viskositeetin kaava 6 antaa tulokseksi rasvahapon metyyliesterin kinemaattisen viskositeetin, joka sillä on 40 asteen lämpötilassa. Kaava 7 ilmoittaa tuloksen koko profiilille.

KAAVA 6. Kinemaattisen viskositeetin määrittäminen yksittäiselle rasvahapon metyyliesterille (Ramírez-Verduzco ym. 2012, 104).

$$\ln(v_i) = -12,503 + 2,496 * \ln(M_i) - 0,178 * N$$

$v_i$  = i:n rasvahapon kinemaattinen viskositeetti 40 °C (mm<sup>2</sup>/s)

KAAVA 7. Kinemaattisen viskositeetin määrittäminen koko profiilille (Ramírez-Verduzco ym. 2012, 110).

$$v = \exp\left(\sum_{i=1}^n w_i * \ln(v_i)\right)$$

$v$  = kinemaattinen viskositeetti koko profiilille (mm<sup>2</sup>/s)

Tiheys 20 asteen lämpötilassa saadaan laskettua yksittäiselle rasvahapon metyyliesterille kaavalla 8. Kaavalla 9 määritetään tiheys koko profiilille.

KAAVA 8. Tiheyden määrittäminen yksittäiselle rasvahapolle (Ramírez-Verduzco ym. 2012, 104).

$$\rho_i = 0,8436 + \frac{4,9}{M_i} + 0,0118 * N$$

$\rho_i$  = i:n rasvahapon tiheys 20 °C (g/cm<sup>3</sup>)

KAAVA 9. Tiheyden määrittäminen koko profiilille (Ramírez-Verduzco ym. 2012, 110).

$$\rho = \sum_{i=1}^n w_i * \rho_i$$

$\rho$  = tiheys koko profiilille (g/cm<sup>3</sup>)

SF-EN 14214 standardissa rajoitetaan linoleenihapon metyyliestereitä. Biodiesel saa sisältää niitä korkeintaan 12 prosenttia kokonaismäärästä. Myös kaksoissidosten määrää rajoitetaan niin, että rasvahappojen metyyliestereitä, joissa on neljä tai useampi kaksoissidos, ei saa olla enempää kuin 1 %

kokonaismäärästä. Niiden määrä näytteissä saadaan suoraan lasketusta rasvahappoprofiilista.

### 5.5 Lipidifraktiointi ohutlevykromatografialla

Ohutlevykromatografialla (Thin Layer Chromatography, TLC) näytteistä määritettiin, mitä lipidiluokkia niissä esiintyi. Lipidiluokista määritettiin fosfolipidit, vapaat rasvahapot ja mono-, di- ja triglyseridit. Tarkoituksena oli selvittää, eroavatko liotinuuton ja SFE:n uuttotuotteet lipidiluokkien perusteella toisistaan.

Lipidiluokkien määrittämisessä standardeina käytettiin fosfolipideille fosfatidyylikoliinia (DL-A-Phosphatidylcholine, Dipalmitoyl, Sigma Aldrich), vapaille rasvahapoille steariinihappoa (Methyl nonadecanoate, analytical standard, sigma Aldrich) ja mono-, di- ja triglyserideille kyseiset lipidiluokat sisältävää standardiseosta (Mono-, Di- and Triglyceride Mix, Supelco). Standardien toimivuus ja tarvittava määrä testattiin ennen varsinaisten näytteiden TLC-ajoa. Taulukossa 5 ovat standardien määrät, jotka aplikoitii TLC-levyille.

TAULUKKO 5. Lipidiluokkastandardien aplikointimäärät

Standardit	määrä (mg)
Fosfolipidit	1
Vapaat rasvahapot	0,5
mono-, di- ja triglyseridit	1,3

Näytteinä käytettiin liotinuutolla ja SFE:llä uutettuja lipidejä, sekä liotinuutolla uudestaan uutettua SFE-uuton jäännösbiomassaa. SFE-ajo ei tuhoa alkuperäistä näytettä, joten SFE-uutettu levänäyte voitiin uuttaa vielä jälkeempään liotinuuton avulla. Tämä tehtiin, koska haluttiin tutkia, mitä lipidiluokkia näytteeseen jäi SFE-uuton jälkeen. Nämä näytteet, eli SFE-uuton residuaalit aplikoitii samalle levyille liotinuuton ja SFE-uuton uuttotuotteiden kanssa. Residuaalit uutettiin samasta näytteestä, josta tässä analyysissä käytettävä SFE-uuttokin tehtiin.

Aplikointimäärät näkyvät taulukossa 6 lajikohtaisesti. Gravimetristen tulosten perusteella tiedettiin, paljonko missäkin näyteputkessa oli lipidejä. Näyteputkeen lisättiin heksaania ja lipidit liotettiin tasaisesti heksaaniin. Liuosta pipetoitiin

uuteen putkeen niin, että lipidien määrä uudessa putkessa oli noin 1 mg. Heksaani haihdutettiin putkesta typpivirran alla.

TAULUKKO 6. *Selenastrum*-kannan ja *Chlorella sorokiniana* lipidinäytteiden aplikointimäärät

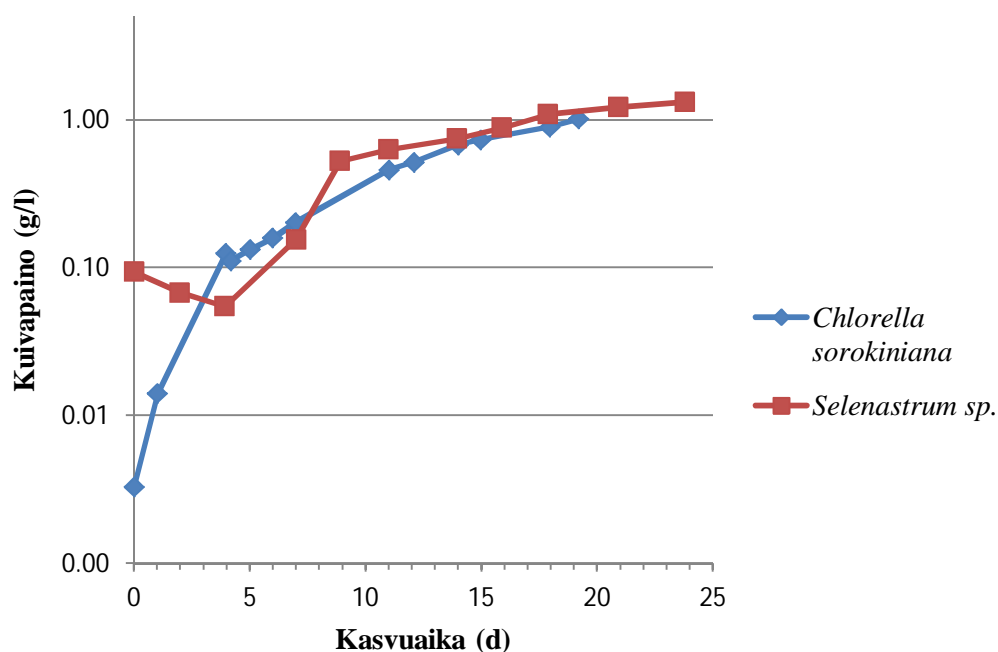
	Chlorella sorokiniana	Selenastrum sp.
Näytteet	aplikoitu määrä (mg)	aplikoitu määrä (mg)
totaalit	1,0	1,0
SFE	1,0	1,0
Residuaalit	1,3	1,0

Kun heksaani oli haihtunut, näytteet liuotettiin 300 mikrolitraan kloroformia ja aplikoitiin Pasteur-pipetillä typpivirran avulla silica G 20 \* 20 cm levyn alalaitaan. Aplikoinnin jälkeen levy siirrettiin kannelliseen lasikammioon, jonka pohjalla oli 111 millilitraa ajoliuosta. Ajoliuoksena käytettiin petroolieetteri:dietyylieetteri:etikkahappoeluenttia (80:30:1). Levyn annettiin olla kammiossa, kunnes eluentti oli noussut sentin päähän levyn ylälaidasta, jolloin levy poistettiin kammioista ja annettiin kuivahtaa. Levy värjättiin rodamiini:vesiliuoksella, jonka pitoisuus oli 0,01 prosenttia ja levyn annettiin taas kuivahtaa. Kuiva levy asetettiin UV-valon alle, jonka avulla lipidifraktiot voitiin nähdä levystä. (Suutari, Rintamäki & Laakso 1996, 1071.) Fraktiot merkittiin lyijykynällä ja levyt valokuvattiin.

## 6 TULOKSET

### 6.1 Levien kasvu

Kuviossa 7 ovat kummankin kasvatuksen kasvukäyrät kuivapainon mukaan. *Chlorella sorokiniana* kasvatettiin 19 päivää, jonka aikana kuivapaino saavutti arvon 1,02 g/l ja *Selenastrum* sp. kasvoi 24 päivää saavuttaen arvon 1,32 g/l. *Chlorella sorokiniana* n kasvu pitoisuus kasvoi koko kasvatuksen ajan, mutta *Selenastrum* sp:n kuivapaino laski lähtötilanteesta lähes 40 mg/l, ennen kuin kasvu lähti nousuun.



KUVIO 7. Reaktorikasvatusten kasvukäyrät kuivapainojen mukaan

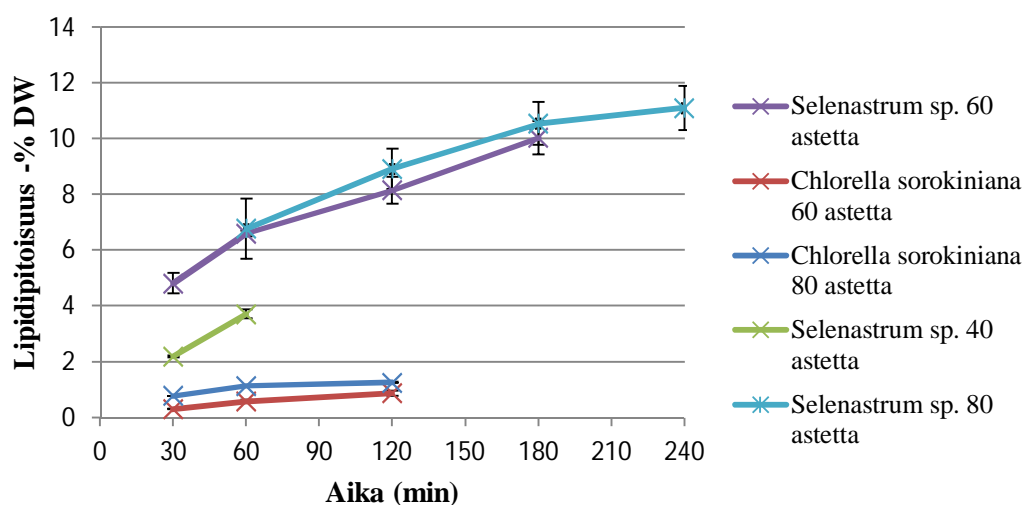
Kasvunopeuden laskemiseksi kummastakin kasvukäyrästä määritettiin eksponentiaaliset kasvun vaihe. *C. sorokinia*-kasvatuksessa se oli ensimmäisen ja neljännen päivän välissä, *Selenastrum*-kasvatuksella kolmannen ja yhdeksännen. Taulukossa 7 ovat spesifiset kasvunopeudet, sekä koko kasvatukselta laskettu keskimääräinen biomassan kasvunopeus. *Selenastrum*-kannan biomassan kasvunopeus määritettiin vasta neljännestä päivästä alkaen kasvun alkuvaiheen romahduksen takia.

TAULUKKO 7. Kasvatuskokeiden keskimääräiset biomassan kasvunopeudet ja spesifiset kasvunopeudet

	Biomassan kasvunopeus (mg/l/vrk)	Spesifinen kasvunopeus ( $d^{-1}$ )
<i>C. sorokiniana</i>	40,3	0,92
<i>Selenastrum sp.</i>	71,3	0,46

## 6.2 Ylikriittisen uuton optimoinnin tulokset

Kuviossa 8 esitetään ylikriittisen uuton optimoinnin tulokset, jossa lipidipitoisuus-% on laskettu lipidien gravimetrisesti määritetyn painon suhteena näytteen alkuperäiseen kuivapainoon. Ylikriittinen uutto uutti vain vähän lipidejä *C. sorokiniana* mikrolevästä, sillä optimaalisimmilla asetuksilla, joissa ajoaika oli 120 min ja lämpötila 80 astetta, saatiin lipidejä vain 1,2 prosenttia kuivapainosta. Pidempää ajoaikaa ei edes koitettu, koska saanto ei käytännössä kasvanut 60 minuutin jälkeen. *Selenastrum sp.* mikrolevästä lipidejä uuttui menetelmällä runsaammin. Optimaalisimmaksi osoittautui 60 astetta ja 180 minuuttia, jolloin lipidisaanto oli 10,0 %. Parhaimmaksi saannoksi saatiin asetuksilla 80 ° ja 240 min jopa 11,1 %, mutta jatkoanalyysyjä ei tästä tehty, koska 80 asteen uutot tehtiin vasta myöhemmin.

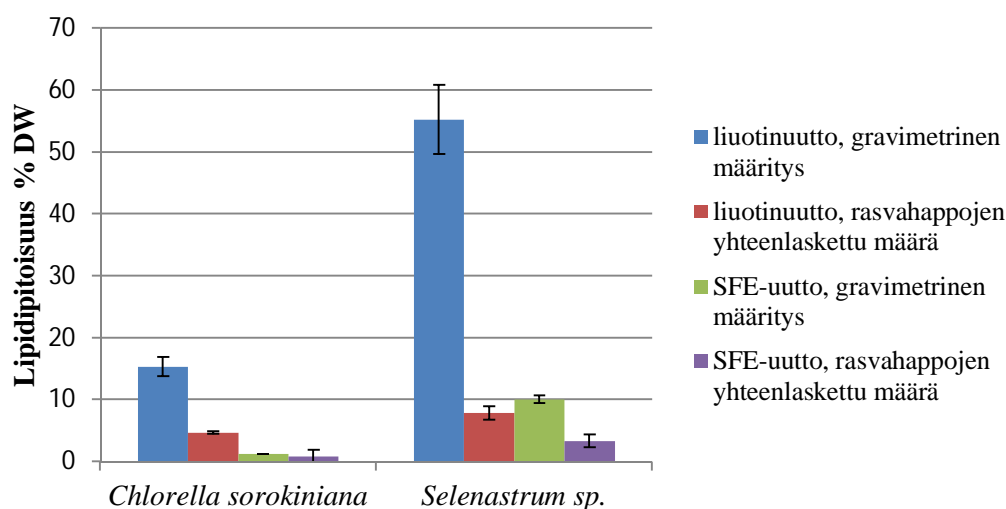


KUVIO 8. SFE-uuton optimoinnin tulokset lipidiosuuksien perusteella prosentteina kuivapainosta (keskiarvo  $\pm$  keskiarvon keskivirhe,  $n = 3$ )

### 6.3 Kokonaislipidien ja kokonaisrasvahappojen määrä sekä rasvahappoprofiili liuotin- ja SFE-utoissa

Kummastakin lajista uuttui liuotinuutolla runsaammin lipidejä kuin ylikriittisellä uutolla. Lipidien määrät näkyvät kuviossa 9, jossa lipidipitoisuus- % tarkoittaa gravimetrisesti määritettyä lipidimäärää näytteen kuivapainoa kohti. *Chlorella sorokiniana* uuttui liuotinuutolla lipidejä 15,3 % kuivapainosta ja *Selenastrum sp.*:stä 55,2 % kuivapainosta. Vastaavasti ylikriittisellä uutolla *Chlorellasta* saatiin 1,2 % ja *Selenastrumista* 10,0 %.

Kuviossa 9 on myös jokaisen gravimetrisesti määritetyn pitoisuuden vieressä vastaava rasvahappojen kokonaismäärällä laskettu pitoisuus. *Chlorellan* liuotinuuton rasvahappojen määrä oli 4,6 % ja ylikriittisen uuton määrä oli 0,9 %. *Selenastrumilla* liuotinuuton rasvahappojen määrä oli 7,9 % ja ylikriittisellä uutolla 3,3 %.



KUVIO 9. Liuotin- ja SFE-uuttojen gravimetrisesti määritetyt lipidisaannot ja rasvahappojen yhteenlasketut kokonaismäärät lajikohtaisesti. (keskiarvo  $\pm$  keskiarvon keskivirhe,  $n(\text{gravimetriset}) = 3$ ,  $n(\text{rasvahapot}) = 2$ )

Taulukossa 8 on esitelty kummallakin uutotavalla uutettujen näytteiden rasvahappoprofiilit prosentteina kokonaismäärästä lajikohtaisesti. Taulukosta jätettiin pois rasvahapot, joita esiintyi alle 1 % niiden pienen merkityksen vuoksi. Taulukkoon on myös eritelty tyydyttyneiden (SFA), kertatyydyttymättömien

(MUFA) ja monityydyttymättömien (PUFA) rasvahappojen suhteelliset osuudet kokonaismäärästä.

TAULUKKO 8. Rasvahappojen suhteelliset osuudet (> 1 %) rasvahappojen kokonaismäärästä

Rasvahappo	<i>Chlorella sorokiniana</i> (%)		<i>Selenastrum sp.</i> (%)	
	Liuotinuutto	SFE-uutto	Liuotinuutto	SFE-uutto
C16:0	33,0 ± 1,6	50,8 ± 0,1	26,3 ± 0,8	22,9 ± 0,0
C16:1	2,0 ± 0,5		1,3 ± 0,1	
C18:0	2,3 ± 0,5		2,9 ± 0,2	2,7 ± 0,0
C18:1n9c	6,7 ± 0,8	6,2 ± 0,3	43,3 ± 1,6	58,1 ± 0,2
C18:2n6c	34,5 ± 0,9	26,9 ± 0,4	7,6 ± 0,3	3,8 ± 0,0
C18:3n3	16,2 ± 0,7	11,2 ± 0,5	9,2 ± 0,3	7,6 ± 0,0
C20:1n9			1,2 ± 0,1	
C24:0			1,7 ± 0,3	
Yhteensä	94,8	95,0	93,4	95,2
SFA (%)	35,4	50,8	30,9	25,7
MUFA (%)	8,8	6,2	45,7	58,1
PUFA (%)	50,7	38,0	16,8	11,4

*C. sorokiniana* ja *Selenastrum sp.* eivät kumpikaan sisältäneet juurikaan palmitoleiini (C16:1)- ja steariinihappoa (C18:0). Palmitiinihappoa (C16:0) oli kummallakin lajilla uuttotavasta riippumatta yli 20 % ja *C. sorokinianalla* sitä oli SFE-uutossa yli 50 % kokonaisrasvahapoista. Öljyhappoa (C18:1n9c) oli *C. sorokinianalla* alle 10 %, jota *Selenastrumilla* oli noin puolet kokonaisrasvahapoista. Linoliyhappoa (C18:2n6c) oli runsaammin *C. sorokinianalla*, jota sillä oli noin neljäsosa, mutta jota oli *Selenastrumilla* alle 10 %. Alfalinoleenihappoa (C18:3n3) oli kummallakin lajilla hieman uuttotavasta riippuen 7-16 %. Gadoleiinihappoa (C20:1n9) ja lingoseriinihappoa (C24:0) oli ainoastaan *Selenastrumin* liuotinuutetussa näytteessä.

*C. sorokiniana* sisälsi kummallakin uuttotavalla alle 10 % kertatytydyttymättömiä rasvahappoja. Liuotinuutolla tyydyttyneitä rasvahappoja uuttui suhteessa vähemmän kuin monityydyttymättömiä, kun taas SFE-uutossa suhteet olivat toisin päin. *Selenastrum sp.* sisälsi kummallakin uuttotavalla suhteessa eniten



kertatyydyttymättömiä rasvahappoja. Vähiten siinä oli monityydyttymättömiä rasvahappoja, SFE-uutolla vain 11 %. Tyydyttyneitä rasvahappoja se sisälsi liuotinuuton osalta kolmasosan ja SFE-uutolla neljäsosan.

Taulukossa 9 rasvahappojen suhteelliset osuudet on esitetty yksikössä mg/g kuiva-ainetta kohti. *Selenastrum*-kannalla esiintyi kummallakin uuttomenetelmällä rasvahappoja enemmän kuin *C. sorokinian*alla. Liuotinuutolla saavutettiin 73,9 mg/g ja ylikriittisellä uutolla 31,4 mg/g. Vastaavat luvut olivat *C. sorokinian*alla 43,6 mg/g ja 8,6 mg/g.

TAULUKKO 9. Rasvahappojen osuus milligrammoina grammaa kuiva-ainetta kohti

Rasvahappo	<i>C. sorokiniana</i> mg/g dw		<i>Selenastrum</i> sp. mg/g dw	
	Liuotinuutto	SFE-uutto	Liuotinuutto	SFE-uutto
C16:0	15,2	4,6	20,8	7,6
C16:1	0,9		1,0	
C18:0	1,1		2,3	0,9
C18:1n9c	3,1	0,6	34,2	19,2
C18:2n6c	15,9	2,4	6,0	1,3
C18:3n3	7,5	1,0	7,3	2,5
C20:1n9			0,9	
C24:0			1,3	
Yhteensä	43,6	8,6	73,9	31,4
SFA (mg/g)	16,2	4,6	24,4	8,4
MUFA (mg/g)	4,0	0,6	36,2	19,2
PUFA (mg/g)	23,3	3,4	13,3	3,8

Taulukossa 10 on sertifioidun oliiviöljystandardin rasvahappoprofiilit prosentteina yhteenlasketusta kokonaismäärästä jokaselta kolmelta analyysipäivältä. Ylimpänä taulukossa on sertifikaatin mukainen jakauma. Itse analysoidut rasvahappoprofiilit eroavat vain vähän sertifikaatin lukemista. Linolihappoa on 2-3 prosenttia vähemmän kuin pitäisi olla ja öljyhappoa taas on vastaavasti 2-3 prosenttia enemmän kuin sertifikaatissa. Näytteitä keskenään verrattaessa oliiviöljyn rasvahappoprofiili on pysynyt kaikkina ajopäivinä lähestulkoon samanlaisena.

TAULUKKO 10. Oliiviöljystandardin profiilit eri analyysipäivinä

Näyte	C16:0	C18:0	C18:1N9c	C18:2N6c
Sertifikaatin mukainen jakauma (%)	11,3	2,9	73,0	10,8
16.10.2012	12,41	3,24	75,81	8,54
13.2.2013	12,22	3,00	77,75	7,04
20.2.2013	11,89	3,44	77,08	7,58

## 6.4 Polttoaineominaisuudet rasvahappoprofiilin perusteella

Taulukossa 11 esitetään kummankin lajin rasvahappoprofiilien perusteella lasketut polttoaineominaisuudet kummallakin uuttotavalla. Ylimpänä taulukossa ovat standardin 14214 mukaiset raja-arvot kullekin ominaisuudelle.

TAULUKKO 11. Lasketut polttoaineominaisuudet kummallakin uuttotavalla.

CN=setaaniluku,  $\rho$ =tiheys,  $v$ =kinemaattinen viskositeetti, C18:3=linoleenihapon metyyliestereiden määrä (%) ja Db=kaksoissidosten määrä, jos yli neljä (%)

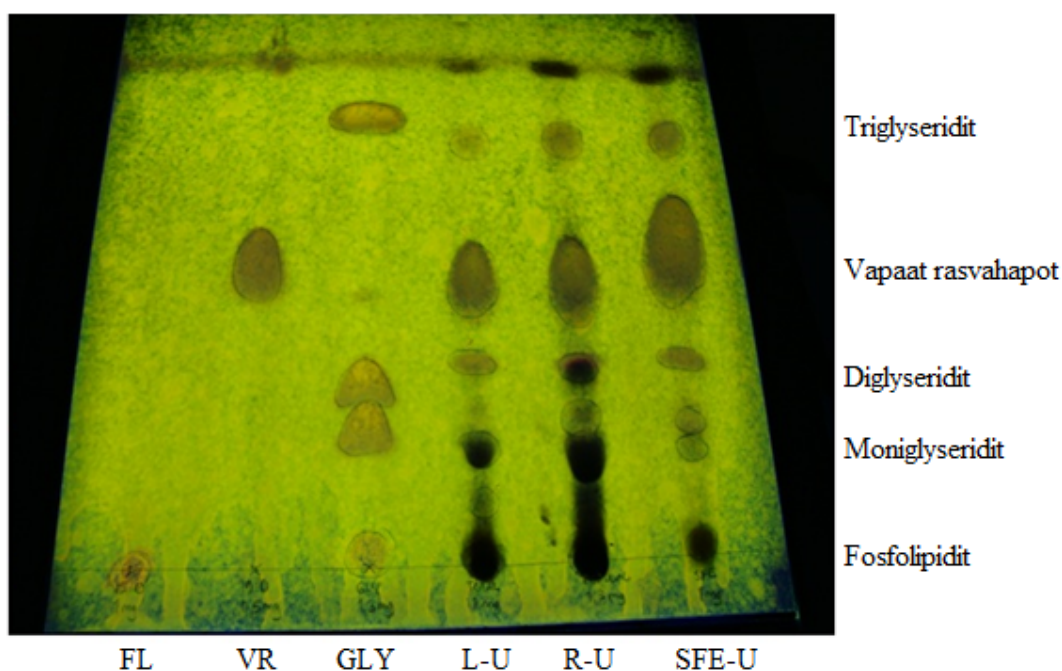
		CN (-)	$\rho$ (kg/m <sup>3</sup> )	$v$ (mm <sup>2</sup> /s)	C18:3	Db $\geq$ 4
SFS-EN 14214 Raja-arvot		$\geq 51,0$	860 - 900	3,5 – 5,0	$\leq 12,0$	$\leq 1$
C. <i>Sorokiniana</i>	Liutinuutto	49,0	830,1	3,66	$16,2 \pm 0,7$	0
	SFE-uutto	54,7	829,9	3,78	$11,2 \pm 0,5$	0
<i>Selenastrum</i> <i>sp.</i>	Liutinuutto	56,9	815,1	3,98	$9,2 \pm 0,3$	0
	SFE-uutto	58,1	828,8	4,09	$7,6 \pm 0,0$	0

Setaaniluku oli yli raja-arvon kaikissa muissa kuin C. sorokinian liutinuuton profiilissa, jossa se jäi niukasti alle 51. SFE-uutolla setaaniluku oli kummallakin lajilla suurempi kuin liutinuutolla. Kaikissa profiileissa tiheys jäi alle vaaditun alarajan 860 kg/m<sup>3</sup>. Muissa profiileissa tiheys oli luokkaa 830 kg/m<sup>3</sup>, mutta *Selenastrum sp.* jäi liutinuuton osalta arvoon 815 kg/m<sup>3</sup>. Kinemaattinen viskositeetti oli jokaisella profiililla sallitulla alueella 3,5 – 5 mm<sup>2</sup>/s. C. *sorokinian* viskositeetti oli hieman pienempi kuin *Selenastrum sp.*:llä. Linoleenihapon metyyliestereitä oli kaikissa uutoissa vähemmän kuin 12 prosenttia, lukuunottamatta C. sorokinian liutinuuttoa, jossa luku ylittyi noin 4

prosenttia. SFE-uutolla linoleenihappoa uuttui prosentuaalisesti vähemmän kuin liuotinuutolla. Yli neljä kaksoissidosta sisältäviä rasvahappoja ei ollut lainkaan, joten raja-arvo alittuu.

## 6.5 TLC

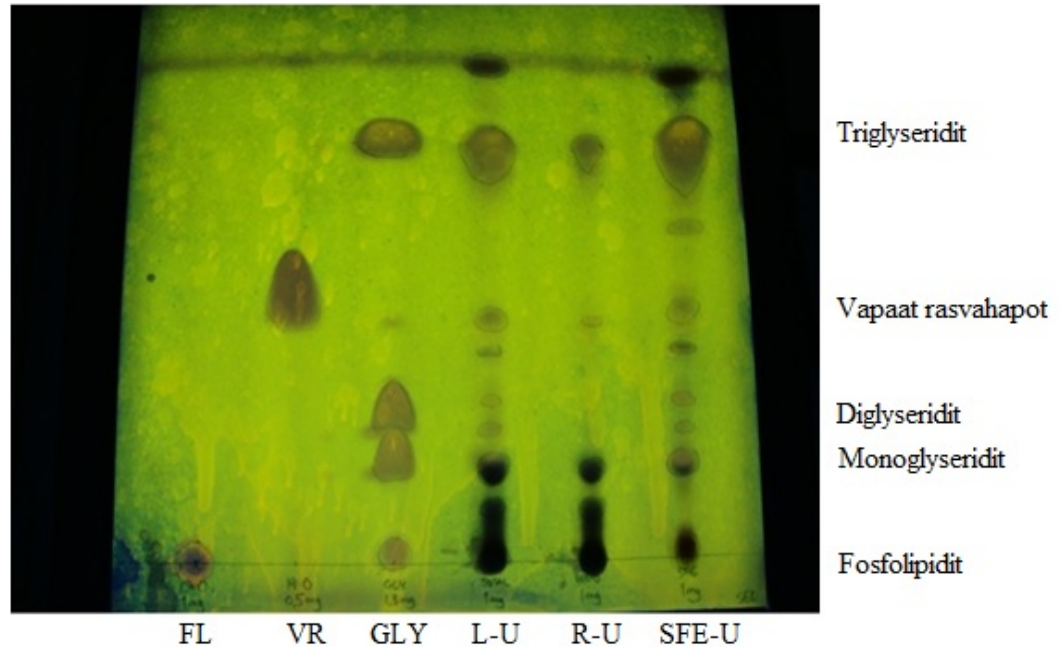
Uuttojen ohutlevykromatografisen analyysin tulokset on esitetty kuvioissa 10 ja 11. Lipidiluokat on ympyröity lyijykynällä. Levyn vasemmassa alalaidassa ensimmäisenä on fosfolipidistandardi, toisena vapaat rasvahapot ja kolmantena mono-, di- ja triglyseridistandardi, jonka lipidiluokat eluoituvat vastaavassa järjestyksessä. Kolme viimeistä aplikointia ovat liuotinuutto, residuaaliuutto, eli liuotinuutto SFE-uutetusta näytteestä ja SFE-uutto.



KUVIO 10. *C. sorokiniana* TLC-tulokset. FL=fosfolipidit, VR=vapaat rasvahapot, L-U=liuotinuutto, R-U=residuaaliuutto, SFE-U=ylikriittinen uutto.

Kuviossa 10 on *C. sorokinianan* ohutlevy. SFE-uutetuissa lipideissä oli runsaasti vapaita rasvahappoja suhteessa muihin lipidiluokkiin. Poolisimpia lipidiluokkia, fosfolipidejä ja mono- ja diglyseridejä oli suhteessa hyvin vähän. Näytteen residuaaliuutto osoittaa, että poolisimmat lipidiluokat olivat jääneet lähes kokonaan uutumatta SFE-uutolla, sillä residuaaliuutossa fosfolipidejä ja mono- ja diglyseridejä oli runsaasti. Triglyseridejä oli SFE-uutossa ja residuaaliuutossa

suunnilleen saman verran. Liuotinuutto uutti näytteestä kaikkia lipidiluokkia. Suhteessa eniten siinä oli vapaita rasvahappoja ja seuraavaksi eniten fosfolipidejä. Glyserideistä eniten oli monoglyseridiä ja vähiten triglyseridiä.



KUVIO 11. *Selenastrum sp.* TLC-tulokset. FL=fosfolipidit, VR=vapaat rasvahapot, L-U=liuotinuutto, R-U=residuaaliuutto, SFE-U=ylikriittinen uutto.

Kuviossa 11 on ohutlevy *Selenastrum sp.*:stä. Missään uutoissa ei ollut juurikaan vapaita rasvahappoja, eikä diglyseridejä. SFE-uuton lipideissä oli eniten triglyseridejä suhteessa muihin lipidiluokkiin. Tälläkään lajilla ei SFE-uutossa uuttunut juurikaan poolisimpia lipidiluokkia. Tämä voidaan todeta residuaaliuutosta, jossa eniten on fosfolipidejä ja monoglyseridejä, eikä muita lipidiluokkia juurikaan esiinny. SFE-uutolla siis uuttuivat lähes kaikki näytteen triglyseridit. Liuotinuutolla lipideistä eniten oli triglyseridejä, mutta runsaasti uuttui myös fosfolipidejä ja monoglyseridejä. SFE-uutolla siis uuttuivat poolittomat lipidiluokat ja liuotinuutolla uuttuivat kaikki näytteessä olevat lipidit.

## 7 TULOSTEN TARKASTELU

### 7.1 Uuttomenetelmien vertailu

Gravimetrinen saanto ja rasvahappoanalyysi perusteella liuotinuutolla saatiin uutettua selvästi enemmän lipidejä kuin ylikriittisellä uutolla. TLC-levyillä tehty analyysi osoitti, että liuotinuutto uutti levistä kaikki lipidiluokat, myös biodieselin tuotannon kannalta epäsuotuisat fosfolipidit. Ylikriittinen uutto uutti levistä lähinnä neutraalit lipidiluokat, joka tekee uuttotuotteesta parempaa biodieselin tuotannon kannalta, mutta saannot olivat pieniä varsinkin *C. sorokinianan* kohdalla, josta ylikriittinen uutto uutti vain prosentin kokonaispainosta. Tämä johtunee siitä, että koska *C. sorokinianan* soluseinän rakenne on vahvempi kuin *Selenastrum*in ja soluja ei hajotettu ennen ylikriittistä uuttoa, lipidit uuttuivat heikosti soluista. Liuotinuuton rasvahappojen metyyliesteriden kokonaismäärä oli kummallakin lajilla suurempi kuin ylikriittisen uuton, joten liuotinuutto on metyyliesterien saannon kannalta parempi uuttomenetelmä biodieselin tuotantoon näillä levälajeilla.

### 7.2 Mikrolevien vertailu

*Selenastrumista* uuttui enemmän lipidejä kuin *C. sorokinianasta* uuttomenetelmästä riippumatta. TLC-levyjen perusteella *Selenastrum* sisälsi myös enemmän biodieselin kannalta oleellisia lipidejä, triglyseridejä suhteessa muihin lipidiluokkiin. *C. sorokinianalla* suhteessa runsaimmin oli vapaita rasvahappoja, jotka soveltuvat huonommin vaihtoesteröintiprosessiin. Näiden tulosten perusteella voidaan sanoa, että *Selenastrum*, kasvatettuna tämän kokeen olosuhteissa sopii paremmin biodieselin tuotantoon kuin *C. sorokiniana*.

Pelkkä gravimetrinen saanto ja lipidiluokkien jakautuminen ei kuitenkaan osoita, soveltuuko kumpikaan laji todellisuudessa biodieselin raaka-aineeksi.

Kokonaislipidien määrä kertoo kaikkien uuttuneiden lipidien määrän, jolloin mukana ovat myös lipidit, joissa ei ole lainkaan rasvahappoja. Näitä ovat esimerkiksi hiilivedyt ja pigmentit. Rasvahappoprofiili ja rasvahappojen yhteenlaskettu määrä ovat oleellisempia biodieseliksi soveltuvuuden kannalta.

*Selenastrum*in liuotinuutetut lipidit sisälsivät lähes kaksi kertaa enemmän rasvahappoja kuin *C. sorokinianalla*. Liuotinuutettujen levien rasvahappoprofiilit erosivat toisistaan erityisesti öljyhapon (C18:1n9c), linolihapon (C18:2n6c) ja alfa-linoleenihapon (C18:3n3) osalta. *Selenastrumilla* oli 5 % vähemmän tyydyttyneitä rasvahappoja kuin *C. sorokinianalla* ja 34 % vähemmän monityydyttymättömiä rasvahappoja. Kertatyydyttymättömiä rasvahappoja oli *Selenastrumilla* 37 % enemmän kuin *C. sorokinianalla*. Kaksoissidosten määrä lisää biodieselin hapettumista ja vaikuttaa näin sen säilyvyyteen. Kertatyydyttymättömät cis-muotoiset rasvahapot toisaalta lisäävät polttoaineen kylmänkestävyyttä. *C. sorokinianalla* yli 50 % rasvahapoista oli monityydyttymättömiä, kun *Selenastrumilla* niitä oli vain 17 %. Rasvahappojen kokonaismäärän ja rasvahappojakauman perusteella liuotinuutettu *Selenastrum* sopii paremmin biodieselin raaka-aineeksi kuin *C. sorokinianan* vastaava.

Polttoaineominaisuuksiensa perusteella liuotinuutettu *Selenastrum* oli parempi kuin *C. sorokiniana*, sillä *C. sorokinianan* liuotinuuton setaaniluku jäi alle vaaditun ja linoleenihappoa oli liikaa. *Selenastrum* täytti kyseiset parametrit. Lisäksi *Selenastrum*in kinemaattinen viskositeetti oli hivenen parempi kuin *C. sorokinianan*. Kummankin lajin uuttojen tiheys jäi kuitenkin alle vaaditun. Kinemaattisen viskositeetin, tiheyden ja setaaniluvun osalta on kuitenkin huomioitava, että ne ovat laskennallisia suureita eivätkä SFS-EN 14214 standardin mukaisilla menetelmillä määritettyjä parametreja. Siksi ne eivät välttämättä täysin vastaa todellisuutta.

## 8 JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli vertailla kahden mikrolevälajin *Chlorella sorokiniana* ja *Selenastrum sp.* soveltuvuutta biodieselin tuotantoon lipidikoostumustensa ja rasvahappoprofiiliensa perusteella.

Polttoaineominaisuuksiensa perusteella kumpikaan laji ei näin kasvatettuna, uutettuna ja analysoituina täytä standardin SFS-EN 14214 asettamia parametreja, mutta liuotinuutettu *Selenastrum sp.* mikrolevä oli lähempänä haluttuja ominaisuuksia kuin *C. sorokiniana*. Tässä työssä tarkasteltiin kuitenkin vain viittä parametria standardin kahdestakymmenestäkuudesta, ja olisikin järkevää tutkia *Selenastrum* myös muiden parametrien osalta, jotta saataisiin kattavampi kuva lajin soveltuvuudesta.

Kokonaislipidien ja rasvahappojen määrän perusteella *Selenastrum* oli selkeästi parempi kuin *C. sorokiniana*, mutta saannot jäivät silti alhaisiksi. Käyttö suuremassa mittakaavassa edellyttäisi biomassan kasvunopeuden ja määrän lisäämistä ja lipidipitoisuuden kohottamista. Jatkotutkimuksissa pitäisikin keskittyä parantamaan saantoa muuttamalla kasvatusolosuhteita ja tehostamalla lipidituottoa.

## LÄHTEET

Autio S. 2011. Kasviplanktonlajiston tunnistus. Pyhäjärvi-säätiö, 2011.

Saatavissa: [http://www.pyhajarvi-instituutti.fi/image/pdf-tiedostot/kasviplankton\\_24\\_8\\_11.pdf](http://www.pyhajarvi-instituutti.fi/image/pdf-tiedostot/kasviplankton_24_8_11.pdf)

Bionova Engineering. 2007. Ehdotus biodieselin laadunvarmistus- ja omaoikeusjärjestelmäksi. Saatavissa:

[http://www.agriforeenergy.com/content/index.php?option=com\\_content&view=article&id=78:finland&catid=42:vegetable-oil-content&Itemid=127](http://www.agriforeenergy.com/content/index.php?option=com_content&view=article&id=78:finland&catid=42:vegetable-oil-content&Itemid=127)

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 2007 Vol. 25: Nro 3. s. 294-306. ISSN 0734-9750.

Christie, W.W. & Han, X. 2010. *Lipid Analysis - Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis*. Bridgwater, U.K: Oily Press.

Grönroos, M. 2012. Biodieseliä mikrolevästä. Opinnäytetyö. Saatavissa:

[http://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/43837/Gronroos\\_Maija.pdf?sequence=3](http://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/43837/Gronroos_Maija.pdf?sequence=3)

Halim, R., Danguah, M. & Webley, P. 2012. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, 2012 Vol 30 s. 709–732. Saatavissa Elsevier: ScienceDirect tietokannassa:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975012000031>

Herrero, M., Cifuentes, A. & Ibanez, E. 2006. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. *Food Chemistry* 98 2006, 136-148 [viitattu 8.2.2013]. Saatavissa Elsevier: ScienceDirect tietokannassa:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605004772>

Hällfors S. & Saloniemi A. Kasviplankton, yksisoluiset perustuottajat.

Itämeriportaali, SYKE. [viitattu 23.10.2014] Saatavissa:

[http://www.itameriportaali.fi/fi/tietoa/elama/elioryhmat/kasvit/fi\\_FI/kasviplankton](http://www.itameriportaali.fi/fi/tietoa/elama/elioryhmat/kasvit/fi_FI/kasviplankton)

Jaakkola, I. 2012. Rasvahappojen kvantitatiivinen määrittäminen. Opinnäytetyö.



Killham, S.S., Kreeger, D.A., Lynn, S.G., Goulden, C.E. & Herrera, L. 1998. COMBO: a defined freshwater culture medium for algae and zooplankton. *Hydrobiologia* 377, 147-159.

Møller A. 2011. Fatty acid molecular weights. Danish Food Information, 2011. Saatavissa:

<http://toolbox.foodcomp.info/References/FattyAcids/Anders%20M%C3%B8ller%20%20%20FattyAcids%20Molecular%20Weights%20and%20Conversion%20Factors.pdf>

NExBTL. 2006. Renewable Synthetic Diesel. [viitattu 8.12.14] Saatavissa:

[http://www.climatechange.ca.gov/events/2006-06-27+28\\_symposium/presentations/CalHodge\\_handout\\_NESTE\\_OIL.PDF](http://www.climatechange.ca.gov/events/2006-06-27+28_symposium/presentations/CalHodge_handout_NESTE_OIL.PDF)

Parrish, C.C. 1990. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. Teoksessa *Lipids in freshwater ecosystems*. New York: Springer-Verlag, 4-20.

Ramírez-Verduzco, L.F., Rodríguez-Rodríguez, J.E. & Jaramillo-Jacob, A.R.

2012. Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition. *Fuel*, 2012 Vol. 91 s. 102–111. Saatavissa Elsevier: ScienceDirect tietokannassa:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236111003942#>

Sirén, H., Perämäki, P. & Laiho, J. 2009. Esikäsittelyn käsikirja. Helsinki: Kemian kustannus.

Suomen Standardisoimisliitto SFS, Standardi SFS-EN 14214, Vahvistettu 8.3.2004.

Suutari, M., Rintamäki, A. & Laakso, S. 1996. The effect of temperature on lipid classes and their fatty acid profiles in *Lipomyces starkeyi*. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73, 1071-1073.

Tredici, M.R. & Zittelli, G.C. 1997. Efficiency of Sunlight Utilization: Tubular Versus Flat Photobioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, 1998 Vol. 57:Nro 2, 188-197.

Öljyalan keskusliitto. Biopolttoaineet liikenteessä. [viitattu 10.12.14.] Saatavissa: <http://www.oil.fi/fi/ymparisto-biopolttoaineet/biopolttoaineet-liikenteessa>